Arbeiten aus dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie
der Universität Göttingen

Ueber den Verlauf des Wachstums bei Bacillus (Proteus) vulgaris

in seiner Abhängigkeit
von einigen Stoffwechselprodukten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen philosophischen Fakultät der Georg-August-Universität
zu Göttingen

vorgelegt von

Rózsi Meller
aus Budapest

Jena
Gustav Fischer
1925

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juli 1924

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonder-Abdruck aus dem Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. II. Abteilung. Herausgegeben von Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. O. Uhlworm in Bamberg, Verlag von Gustav Fischer in Jena. 64. Band. 1925. S. 1—32.

I. Einleitung.

Stellen wir die Vermehrung von Bakterien in einem konstanten Kulturmedium, also unter künstlichen Bedingungen, graphisch dar, so scheint die erhaltene Kurve ihrem Wesen nach mit der Wachstumskurve der höheren Pflanzen identisch zu sein[1]). Sie müßte sich also (in ihrem 1. Teil) wie eine logarithmische Kurve verhalten, falls sie überhaupt ideal verliefe. Dies tut sie aber in Wirklichkeit niemals. Betrachten wir eine solche „Wachstumskurve", wobei unter Wachstum natürlich nicht das Wachstum eines Individuums, sondern das „Wachstum" (die Vermehrung) einer ganzen Kultur zu verstehen ist, so sehen wir, daß die Kurve eine mit den gegebenen Bedingungen wechselnde Zeit flach verläuft, dann plötzlich steil ansteigt und, nachdem sie etwas abflacht, ziemlich unvermittelt den höchsten Punkt erreicht.

Dieses anfängliche flache Verlaufen der Kurve läßt sich, wenigstens in den untersuchten Fällen, mit der Vermehrungsart der Bakterien allein nicht erklären. Es ist natürlich, daß bei einer Vermehrungsart, wo aus einer Zelle 2, —4, —8, —16 usw. Zellen entstehen, die Kurve anfangs flach, dann immer steiler und steiler verlaufen muß. Doch die Generationsdauer — und diese ist bei bekanntem Endwert zu einer bestimmten Zeit leicht zu berechnen — muß zunächst immer dieselbe sein, während sie später größer wird. Dies ist aber nicht der Fall. Wir wissen schon aus einer älteren Arbeit von Rahn, der die Wachstumsverhältnisse bei Pseudomonas fluorescens liquefaciens untersucht hat, daß die Generationsdauer in den ersten Stunden nach der Impfung länger ist als später; also zunächst sinkt und dann erst wieder ansteigt. Das gibt uns die Berechtigung, in diesem flach verlaufenden Teil eine Hemmungszone zu sehen. Nach Rahn ist diese Hemmung am geringsten bei einer bestimmten Konzentration eines von den Bakterien selbst gebildeten Stoffes. Schon vorher machten Müller und Hehewerth die von Rahn nicht bestätigte Angabe, daß die anfängliche Wachstumshemmung auch vom Alter der Kulturen abhängig sei. Wir werden im folgenden die Änderung der Hemmungszone unter dem Einfluß verschiedener anderer Ursachen sehen.

---

[1]) An Stelle weiterer Ausführungen über die Wachstumskurve, soweit sie nicht zum Verständnis des Folgenden erforderlich sind, verweise ich auf Rippel.

Vergleichen wir mehrere Kurven auf ihre Hemmungszone hin, so müssen wir verschiedene Arten dieser Hemmung auseinander halten. Die Hemmungsvergrößerung einer Kurve im Vergleiche mit anderen kann eine absolute sein, falls es sich um den Vergleich der tatsächlich gefundenen Werte handelt, und eine relative, wenn die Unterschiede trotz Umrechnung aller Kurven auf denselben Endwert (Zeit und Ertrag = 100) bestehen bleiben. (Vgl. z. B. Kurve 1 u. 1a.) Letzteres bedeutet eine Änderung im Wesen der Kurve. Im 1. Fall können wir dann noch zwischen Zeithemmung und Ertragshemmung unterscheiden, je nachdem die Hemmung sich nur in der Verlängerung der Zeit, nach der der höchste Punkt erreicht wird, oder auch in der Höhe dieses Punktes äußert.

Wollen wir die Entwicklung einer Kultur in einem konstanten Nährmedium verfolgen, so dürfen wir aber bei dem Maximalpunkt der Kurve, dem Ende der eigentlichen Vermehrungskurve, nicht stehen bleiben, sondern müssen diese über ihren höchsten Punkt hinaus auch in dem abfallenden Teil verfolgen. Diesen Teil dürfen wir nicht schlechthin einer Absterbekurve, wie wir sie z. B. unter Einfluß von keimtötenden Giften bekommen, gleichsetzen. Da würde es sich nämlich um eine echte Absterbekurve handeln, da überhaupt keine Vermehrung mehr erfolgt, während in ersterem Falle noch eine Neubildung von Zellen stattfindet, nur daß sie von den autolytischen Vorgängen verdeckt wird.

Diesem 2. Teile der Kurve wurde bis jetzt wenig Beachtung geschenkt. Es wurde offenbar stillschweigend angenommen, daß für das Gedeihen einer Kultur unter bestimmten veränderlichen Bedingungen die Höchstzahl der Keime und die Zeit, nach welcher diese Höchstzahl erreicht wird, allein maßgebend ist, der nachherige Abfall der Keimzahl, der Verlauf der Autolyse dagegen innerhalb derselben Art stets der gleiche bleibt. Wir werden im folgenden sehen, daß das nicht der Fall ist. Der Abfall nach Erreichung des Maximalwertes — das soll hier vorweggenommen werden — ist abhängig von den Einflüssen, welchen die Kultur vor Erreichung des Höchstpunktes ausgesetzt war, oder von dem vitalen Zustand der Zellen, die ihn erreicht haben.

Dies alles mußte vorweggenommen werden, um die Begriffe, auf die es uns später ankommt, klar zu stellen. Das Problem, welches behandelt werden sollte, war ungefähr folgendes:

Eine Zelle oder eine Kultur (in unserem Falle sprechen wir von einer Gesamtheit von Zellen, da es sich um ein geschlossenes System von Nährmedium einerseits und Lebewesen anderseits handelt) hat, wie sich das ganz allgemein sagen läßt, einen gewissen Fond an Energie. Diese Energie wird einerseits als solche akut wirksam, anderseits ist sie in den verschiedenen Stoffen — Systemen — aufgespeichert. Alle diese Systeme, die vielfach einander entgegengesetzt gesinnt sind, wie z. B. das System der aufbauenden (etwa der eiweißbildenden) und der auflösenden (lytischen) Kräfte halten sich in dem normalen Zellhaushalt das Gleichgewicht. Latent aber ist jedes ein System für sich mit einer eigenen Richtungstendenz. Es kann nun der Fall eintreten, daß das Gleichgewicht zugunsten des einen Systems verschoben wird. Das muß sich in der Form der vorhin behandelten Gesamtkurve (bestehend aus dem 1. aufsteigenden und dem 2. abfallenden Teil) äußern. Wir wollen dabei vorderhand von der Art der Ursachen, die diesen Fall hervorrufen, ganz absehen — ob sie als Nährstoffmangel, als Einfluß

bestimmter Stoffe oder der Temperatur, oder auch als Veränderung der Eigenschaften des Organismus wirken.

Das krasseste Beispiel einer Gleichgewichtsstörung ist das d'Herellesche Phänomen, das wir mit vielen anderen also von diesem Gesichtspunkte aus auffassen wollen (s. unten S. 28) oder die Auflösung des Pyocyaneus durch sein eigenes Ferment. (Überhaupt die Autolyse, bei der die lytischen Kräfte die Oberhand gewinnen.)

Lassen sich nun zu diesen extremsten Beispielen von Gleichgewichtsstörung Übergänge finden? Kann man in Kulturen, deren Entwicklungsgang noch der Norm entspricht, schon Schwankungen nachweisen, welche die Richtung oder die Art des späteren Gleichgewichtsumschwunges andeuten? Und drücken sich diese Unterschiede in der Form der Kurve aus? Oder mit Rücksicht auf die Versuchsmethodik anders gefaßt: lassen sich in der Form der Keimzahlkurve Unterschiede aufweisen, welche unter ganz konstanten Außenbedingungen nur durch solche Ursachen hervorgerufen werden, die ihren Ursprung ausschließlich in der Bakterienzelle selbst haben? Und wenn ja, welcher, eventuell stofflichen, Art sind diese Ursachen und wie wirken sie?

Neuerdings wurde von mehreren Seiten (siehe u. a. bei Bürgers und Bachmann) die Vermutung ausgesprochen, daß diese Art Stoffe zu den Bakteriophagen des d'Herelleschen Phänomens Beziehungen haben könnten. Das wäre gleichbedeutend damit, daß diese hemmenden Stoffe nicht geradlinig schädigend wirken, sondern auf eine jedenfalls komplizierte, unbekannte Art und an einer unbekannten Stelle in das Zelleben eingreifen. Dafür bieten aber die Arbeiten, welche sich mit den wachstumshemmenden Stoffen beschäftigt haben, keine Anhaltspunkte, besonders, weil sie nicht im Sinne der „Vermehrung" des schädlichen Prinzips fortgeführt wurden. Im Gegenteil zeigt z. B. Lode, daß bei B. pyocyaneus das serienweise fortzüchtbare bakteriolytische Prinzip (Bakteriophage) nicht mit dem bekannten antagonistischen identisch ist, Schmidt und Greifenstein, daß es sich in Filtraten alter Staphylokokkenkulturen auch um mehrere Prinzipien handelt.

Es sollte zuerst untersucht werden, ob durch B. Proteus vulgaris ein ähnliches Prinzip gebildet wird, und ob tatsächlich schlechthin von einem hemmenden Stoff, also von einem Stoff, der unter allen Umständen geradlinig diese seine Wirkung entfaltet, die Rede sein kann. Das natürlichste wäre die Anschauung, daß über ein aus den Zellen selbst entspringendes Prinzip nie im Sinne „schädlich oder günstig" geurteilt werden kann, sondern daß es immer auf die gegebenen Umstände ankommt, wie es auf die Gesamtheit der Zellen einwirkt.

Die Versuche wurden mit B. Proteus vulgaris ausgeführt. Er wurde gewählt, weil er infolge der großen Spielweite seiner Wachstumsmöglichkeit, gleichzeitig infolge seiner großen Anpassungs- und Variationsfähigkeit gut zur Beantwortung unserer Fragen geeignet schien.

II. Vorversuche.

Eijkman fand, daß B. coli auf einem festen Nährboden, auf dem es schon einmal gewachsen war, nicht oder nur in geschwächtem Maße von neuem zur Entwicklung gebracht werden kann. Der Grund dafür liegt nicht in der Erschöpfung der Nährstoffe, auch nicht in der Anhäufung von Stoffwechselprodukten, da die Wachstumshemmung schon nach einer 3tägigen Vorbehandlung in Erscheinung tritt, und nicht auftritt, wenn die betreffende Nährlösung vorher auf 100° erhitzt wurde. Stoffwechsel-

produkte nimmt man im allgemeinen als hitzebeständig an. Es muß sich also um die Bildung eines entwicklungshemmenden, thermolabilen Stoffes handeln, der, wie die weiteren Untersuchungen Eijkmans ergaben, durch Agar diffundiert und bei längerem Lagern zersetzt wird. Am stärksten ist seine Wirkung auf dem homologen Coli-Stamm, doch werden auch andere Coli-Stämme deutlich in ihrem Wachstum gehemmt.

Die Ergebnisse Eijkmans wurden von Conradi und Kurpjuweit bestätigt und erweitert. Sie wiesen den entwicklungshemmenden Stoff auch in flüssiger Nährlösung (Bouillon) nach und hielten ihn oft für wirksamer als Karbolsäure. Sie teilten die Ansicht Eijkmans, daß es sich um eine Allgemeinerscheinung bei Bakterien handelt, und sahen darin den Grund, aus dem die Kulturen ihr Wachstum einstellen. Pansini, Öbius, Rolly und Manteufel u. a. haben diese Anschauung zurückgewiesen, und auch Eijkman hat sich gegen die zuweit gehenden Folgerungen von Conradi und Kurpjuweit geäußert. Alle die genannten Forscher fanden, daß die beschriebenen Erscheinungen sich sehr gut durch die Verarmung des Nährbodens erklären lassen. Die Stichhaltigkeit ihrer Erwiderungen beruht einerseits auf der primitiven Versuchsanordnung Eijkmans, andererseits darauf, daß einige von ihnen die Thermolabilität des hypothetischen Stoffes nicht bestätigen konnten. Daß der Nährstoffmangel nicht die Ursache des frühen Absterbens mancher Arten sein kann, darauf soll hier als auf eine bekannte Tatsache nur hingewiesen werden.

Es sollte geprüft werden, ob sich bei B. Proteus ähnliche Verhältnisse vorfinden. Zur ersten Orientierung wurde die Methodik Eijkmans benutzt:

Versuchsobjekt war B. (Proteus) vulgaris Hauser-Krombholz Nr. 8 und B. Proteus vulgaris Graßberger, beide Stämme aus der Král schen Sammlung in Wien bezogen. Eine Anzahl Röhrchen wurden mit je 5 ccm Nährlösung beschickt, mit Proteus beimpft und 3—8 Tage lang bei einer konstanten Temperatur gehalten. Von diesem ersten Wachstum soll im folgenden der Kürze halber als von der Vorbehandlung gesprochen werden. Danach wurde der Versuch unterbrochen, die Röhrchen mit ungefähr gleichem Wachstum ausgesucht. Die Hälfte dieser Röhrchen wurde 1 Std. lang im Wasserbad von 100° gehalten, die andere Hälfte blieb unbehandelt. Die gleiche Anzahl Röhrchen wurde mit 5 ccm 4proz. Agars beschickt, dann wurde sterilisiert. Beide Reihen, sowohl die Röhrchen mit dem Agar, wie die Röhrchen mit der Kulturflüssigkeit wurden im Wasserbad von 50° vorgewärmt. Je ein Röhrchen mit der Kulturflüssigkeit wurde nun zu je einem Röhrchen mit dem flüssigen Agar gegossen, gut durchgeschüttelt und dann schräg zum Erstarren gebracht. Die nicht gleichmäßig erstarrten Röhrchen wurden verworfen, auf die Schrägfläche der anderen wurde mit einer Öse voll einer dünnen Proteus-Aufschwemmung ein Strich angelegt. Beide Impfungen (so die zur Vorbehandlung wie die Neuimpfung) wurden mit einer Aufschwemmung einer 24stünd. Kultur vorgenommen.

Bereits der erste Versuch (Tab. 1) zeigt in den Röhrchen mit nicht erhitzter Kulturflüssigkeit eine schwächere Entwicklung des Striches, als in denen mit erhitzter Kulturflüssigkeit, obwohl die Vorbehandlung nur 4 Tage lang dauerte.

Tabelle 1.

12 Röhrchen mit je 10 ccm Bouillon, davon zwei als Kontrolle unbeimpft, die anderen mit Proteus beimpft. Dauer der Vorbehandlung 4 Tage, Temperatur 22°.

Nr.	Behandlung	Wachstum
1	Kontrolle	+++
2	„	+++
3	gekocht	+++
4	„	+++
5	„	+++
6	„	+++
7	„	+++
8	nicht gekocht	++
9	„ „	+
10	„ „	+++
11	„ „	++
12	„ „	++

Die Stärke des Wachstums wurde mit Kreuzen bezeichnet. Die Beobachtung erfolgte immer am 3. Tage nach der Anlegung des Striches, später wuchsen nämlich die im Agar überall verteilten Zellen in den unerhitzten Röhrchen heran.

Tabelle 2.

Nährlösung 10 ccm Hefewasser. Sonst wie Tabelle 1.

Nr.	Behandlung	Wachstum
1	Kontrolle	+++
2	„	+++
3	gekocht	+++
4	„	+++
5	„	++
6	„	+++
7	„	+++
8	nicht gekocht	++
9	„ „	+
10	„ „	+
11	„ „	+
12	„ „	++

Derselbe Versuch wurde auf einer anderen Nährlösung (Hefewasser) mit demselben Ergebnis wiederholt (Tab. 2). Das Wachstum war im allgemeinen etwas schwächer als auf Bouillon (die Bezeichnung der Wachstumsintensität hat nur innerhalb desselben Versuches einen Vergleichswert), doch ist der Unterschied zwischen erhitzter bzw. nicht erhitzter Kulturflüssigkeit auch hier deutlich zu sehen. Röhrchen Nr. 9 zeigte insofern ein von den anderen nicht erhitzten Röhrchen verschiedenes Verhalten, als der angelegte Strich sich zwar auch nur schwach entwickelte, aber die im Agar überall verteilten Keime schon nach 2 Tagen kräftig wuchsen.

Tabelle 3.

Nährlösung 10 ccm Hefewasser. Dauer der Vorbehandlung 8 Tage. Temp. 30°.

Nr.	Behandlung	Wachstum
1	Kontrolle	+++
2	„	+++
3	gekocht	+++
4	„	++++
5	„	+++
6	„	+++
7	„	+++
8	nicht gekocht	++
9	„ „	+
10	„ „	—
11	„ „	+
12	„ „	—

Tabelle 3 zeigt einen Versuch, bei dem die Vorbehandlung (das erste Wachstum) 8 Tage dauerte. In den Röhrchen mit erhitzter Kulturflüssigkeit ist die Entwicklung am Strich noch ebenso stark wie in den Kontrollröhrchen, dagegen findet in den nicht erhitzten Röhrchen nur ein ganz schwaches Wachstum statt. Noch deutlicher zeigt sich der Unterschied nach einer 14tägigen bzw. 21tägigen Vorbehandlung (Tab. 4 u. 5).

Mit der Zunahme der Vorbehandlungsdauer nimmt die Größe der Hemmung innerhalb der geprüften Zeiten also zu.

Tabelle 6 zeigt einen Versuch, bei dem vor der Neuimpfung jedem Röhrchen 1% Pepton zugesetzt wurde. Die Ergebnisse waren ähnliche wie die vorhergehenden, wenn auch etwas verwischter. Daß die Nährstoffverarmung keine wesentliche Rolle spielt, geht noch deutlicher aus späteren Versuchen hervor (S. 9).

Tabelle 4.

Dauer der Vorbehandlung 14 Tage. Sonst wie Tabelle 3.

Nr.	Behandlung	Wachstum
1	Kontrolle	++++
2	„	+++
3	gekocht	+++
4	„	+++
5	„	++++
6	„	++
7	„	+++
8	nicht gekocht	—
9	„ „	—
10	„ „	+
11	„ „	++
12	„ „	—

Tabelle 5.

Dauer der Vorbehandlung 21 Tage. Sonst wie Tabelle 3.

Nr.	Behandlung	Wachstum
1	Kontrolle	++++
2	„	+++
3	gekocht	+++
4	„	++
5	„	+++
6	nicht gekocht	—
7	„ „	—
8	„ „	—

Tabelle 6.

Nährlösung 10 ccm Hefewasser. Dauer der Vorbehandlung 8 Tage, darauf Zusatz von 1% Pepton vor dem Vermengen mit Agar. Temp. 22°.

Nr.	Behandlung	Wachstum
1	Kontrolle (mit Pepton)	+++++
2	Kontrolle (ohne Pepton)	+++
3	gekocht	++++
4	„	++++
5	„	++++
6	nicht gekocht	++
7	„ „	++++
8	„ „	+++

Auf Grund dieser Versuche muß also angenommen werden, daß auch B. vulgaris einen das Wachstum der eigenen Art hemmenden thermolabilen Stoff bildet. Dieser Stoff hemmt am stärksten den homologen Stamm, aber auch ein anderer Proteus stamm wird in seinem Wachstum gehindert, wie gleichartige Versuche mit einigen anderen Stämmen zeigten. Die Wachstumshemmung tritt in schwachem Maße auch dann noch auf, wenn die erstarrte Fläche mit einer zweiten Schicht gewöhnlichen Agars bedeckt und auf dieser geimpft wird. Das hemmende Prinzip diffundiert also durch Agar; B. Proteus verhält sich ähnlich, wie es Eijkman für Coli fand.

Nebenbei wurden auch ein bis zwei andere Arten wahllos auf diese Eigenschaft geprüft. Pseudomonas fluorescens liquefaciens verhielt sich ebenso, wie das aus den Arbeiten von Olitzky, Rahn u. a. auch schon bekannt ist, desgleichen B. Mesentericus fuscus, während bei B. gyroides — allerdings auf völlig erschöpftem Nährboden — kein Unterschied bemerkbar war (Tab. 7—9).

Tabelle 7.

Versuchsobjekt B. fluorescens liquefaciens. Nährlösung 10 ccm Bouillon. Zimmertemperatur.

Nr.	Dauer der Vorbehandlung in Tagen	Behandlung	Wachstum
1	6	Kontrolle	++++
2	6	„	+++
3	6	gekocht	++
4	6	„	++
5	6	„	+
6	6	nicht gekocht	—
7	6	„ „	—
8	6	„ „	—
9	12	Kontrolle	++++
10	12	„	++++
11	12	gekocht	+++
12	12	„	++
13	12	„	++
14	12	nicht gekocht	—
15	12	„ „	—
16	12	„ „	—

Tabelle 8.

Versuchsobjekt B. gyroides. Nährlösung 10 ccm Hefewasser. Dauer der Vorbehandlung 91 Tage. Zimmertemperatur.

Nr.	Behandlung	Wachstum
1	Kontrolle	++++
2	gekocht	++
3	„	+
4	„	—
5	„	—
6	nicht gekocht	+
7	„ „	—
8	„ „	+

Tabelle 9.

Versuchsobjekt B. Mesentericus fuscus. Nährlösung: Hefewasser. Dauer der Vorbehandlung: 10 Tage. Zimmertemperatur.

Nr.	Behandlung	Wachstum
1	Kontrolle	+++
2	gekocht	++++
3	„	++++
4	„	++++
5	nicht gekocht	+
6	„ „	+
7	„ „	—

Tabelle 10 und 11 zeigen Versuche, bei denen die Kulturflüssigkeit vor dem Vermischen mit Agar durch eine bakteriendichte d e H a ë n sche Membran filtriert wurde. Irgendeine Wirkung von seiten des Bakterienleibes selbst wurde dadurch ganz ausgeschaltet. Die Ergebnisse waren wie sonst, nur daß der Versuch noch klarer wurde.

Tabelle 10. B. Proteus.

Nährlösung Hefewasser. Dauer der Vorbehandlung 8 Tage, danach filtrieren der Kulturflüssigkeit, Behandlung des Filtrates (Vermengen mit Agar usw.) wie sonst. Zimmertemperatur.

Nr.	Behandlung	Wachstum
1	Kontrolle	+++
2	„	+++
3	gekocht	+++
4	„	+++
5	„	++
6	nicht gekocht	—
7	„ „	—
8	„ „	+

Tabelle 11. B. Proteus.

Nährlösung Hefewasser. Dauer der Vorbehandlung 3 Tage, danach filtrieren. Neuimpfung mit 24stünd. bzw. 14tägiger Kultur eines Proteusstammes.

Nr.	Behandlung	Neuimpfung	Wachstum
1	Kontrolle	junge Kultur	++++
2	„	„ „	++++
3	gekocht	„ „	+++
4	„	„ „	++++
5	nicht gekocht	„ „	++
6	„ „	„ „	++
7	Kontrolle	alte „	++
8	„	„ „	++
9	gekocht	„ „	+++
10	„	„ „	+++
11	nicht gekocht	„ „	+++
12	„ „	„ „	++

Ein interessantes Ergebnis zeigt Tabelle 11. Während die erste Impfung (zur Vorbehandlung), wie bisher mit einer jungen Kultur geschah, wurde zur zweiten (Strich-) Impfung (also nach dem Agar-Zusatz) auch eine alte Kultur verwendet. Während nun der mit der jungen Kultur beimpfte Strich sich am stärksten in den beiden Kontrollröhrchen und in dem einen erhitzten, — etwas weniger in dem anderen erhitzten und schwach in den unerhitzten Röhrchen zeigte, entwickelten sich von den mit der alten Kultur beimpften Strichen die in den vorbehandelten Substraten am besten (Nr. 9—11) (wenn auch nicht so stark wie Nr. 1 und 2, die mit junger Kultur beimpften Kontrollröhrchen), besser als die auf der noch unzersetzten Kontrolle. Zwischen erhitzt und unerhitzt war kaum ein Unterschied zu sehen. Es scheint also, als ob alte Kulturen in einem Substrat, in dem schon einmal die alte Art wuchs, besser gediehen als auf frischer Nährlösung. Auf S. 25 wird darauf noch zurückzukommen sein.

Da, wie oben erwähnt, diese Versuchsanordnung nicht volle Beweiskraft besitzt und außerdem nichts über die Art der Hemmung auszusagen vermag, wurde an eine genaue Verfolgung der Vermehrung geschritten. Alles, was auf die Keime in irgendeinem Sinne begünstigend oder schädigend einwirkt, muß seine Wirkung in der Höhe und eventuell in der Form der schon be-

sprochenen Keimzahlkurve äußern. Die Ergebnisse der bisherigen Versuche aber können wir dahin zusammenfassen, daß durch B. Proteus vulgaris anscheinend ein Stoff in das Nährsubstrat ausgeschieden wird, welcher die Vermehrung hemmt. Er ist thermolabil, diffundiert durch Agar und läßt sich durch bakteriendichte Membranfilter filtrieren. Beim langen Lagern wird er vernichtet. Wurden nämlich die Röhrchen mit unerhitztem Substrat der vorigen Versuche längere Zeit aufbewahrt, so trat wieder Wachstum ein. Eine alte Kultur zeigte ein insofern verschiedenes Verhalten, als sie auf den schon einmal bewachsenen Substraten — auch auf den nicht erhitzten — ein kräftigeres Wachstum zeigte, als auf dem frischen Kontrollmedium.

III. Der erste Teil der Keimzahlkurve.

Zuerst wurde ein Versuch zur groben Orientierung ausgeführt. Es wurden eine Anzahl Kolben mit Ammoniumphosphat, Ammoniumnitrat bzw. Asparaginlösung als Nährsubstrat[1]) mit Proteus beimpft und 3—6 Tage wachsen gelassen. Dann wurde der Versuch unterbrochen, der Inhalt eines jeden Kolbens für sich durch bakteriendichte de Haën-Membran filtriert und in den sterilen Filtraten die ursprüngliche schwach alkalische Reaktion mit Hilfe von Lackmuspapier hergestellt. Die Hälfte der Kolben wurde 2 Min. auf 100° erhitzt, dann allen 50% der ursprünglichen Nährstoffe zugesetzt und neu mit Proteus beimpft. Nach 3 Tagen wurde wieder abfiltriert, die Reaktion hergestellt und Nährstoffe zugesetzt. Wieder wurde die Hälfte der Kolben auf 100° erhitzt — natürlich dieselben, die auch zum erstenmal erhitzt wurden — und neu beimpft. Das Wachstum war in den unerhitzten Lösungen diesmal kaum mehr merklich, während die erhitzten sich stark trübten. Nachdem dieselbe Prozedur noch ein drittesmal wiederholt wurde, zeigten die unerhitzten Filtrate keine Spur von Wachstum mehr.

Nun sollte an eine genauere Untersuchung der Wachstumskurven geschritten werden, um festzustellen, wie das betreffende hemmende Prinzip wirkt. Vernichtet es einen Teil der Zellen oder verlangsamt es ihre Vermehrung im allgemeinen?

Methodik. Da im Verhalten von jungen und alten Kulturen evtl. ein Unterschied bestehen kann, mußte ein betreffs seines Alters streng einheitliches Material geschaffen werden. Deshalb wurde als junge Kultur stets eine 24 stünd. Schrägagarkultur verwendet, die durch Abimpfen von einer anderen 24stünd. Kultur derselben Art gewonnen wurde. Diese war wieder ebenso gewonnen usw. In dieser Weise resultierte ein Material, das vor allen Altersveränderungen sicher bewahrt blieb.

Es sollte das Wachstum auf normaler Nährlösung bzw. auf 3—8—23 Tage vorbehandeltem Filtrat festgestellt werden. Bouillon bzw. Hefewasser dienten als eiweißhaltige, Asparagin-, Ammoniumphosphat-, Ammoniumnitratlösungen als eiweißfreie Nährlösungen. Die erste Impfung (zur Vorbehandlung der frischen Nährlösung) geschah mit einem Tropfen einer sehr stark verdünnten Aufschwemmung einer 24stünd. Schrägagarkultur. Nach 3—8 bzw. 21 Tagen wurden die Kulturflüssigkeiten durch de Haëns bakteriendichte Membran filtriert. Die Filtrate wurden im Vakuum auf ¼ ihrer ursprünglichen Menge eingedampft und auf ihre ursprüngliche, schwach alkalische Reaktion gebracht. Dann wurde ihre Sterilität geprüft und, nachdem sie sich als keimfrei erwiesen haben, mit ¾ Teilen frischer Nährlösung zusammengebracht. Die so hergestellten Lösungen wurden von neuem beimpft entweder wieder mit einer, wie vorhin beschriebenen 24 stünd. oder mit alten Kulturen.

Um diese ganze Behandlung bei allen Filtraten gleichzeitig ausführen zu können und besonders um die Neuimpfung mit einer Aufschwemmung derselben Kultur vor

[1]) Genaue Nährstoffangabe s. unter den betreffenden Figuren.

nehmen zu können, wurden die Nährlösungen zu verschiedenen Zeiten zur Vorbehandlung angesetzt. Z. B. wurde die Nährlösung, die als 21 Tage altes Filtrat dienen sollte, 13 Tage früher beimpft, als die, welche als 8tägiges Filtrat verwandt werden sollte. (Ein Aufbewahren der Filtrate war nicht möglich, da der hemmende Stoff dabei seine Wirksamkeit einzubüßen scheint.)

Die Beimpfung der Filtrate geschah mit einer so geringen Menge von Keimen, daß diese vernachlässigt werden konnte. Die Zahl der Keime wurde mit dem Plattenverfahren festgestellt. Als Nährmedium diente dabei die der Kulturflüssigkeit homologe Agarlösung, also Hefewasser-, Bouillonagar usw.

Jede Kurve stellt den Mittelwert aus 3 Parallel-Versuchen dar, mit Ausnahme der Kurven, welche Versuche mit alten Kulturen veranschaulichen. Diesen liegt aus Gründen, die später ersichtlich werden, nur ein Versuch zugrunde, nur die Zählung wurde immer 3fach nach verschiedenen Verdünnungsmethoden (Entnahme von 1 ccm, 0,1 ccm, 1 Öse voll Flüssigkeit) vorgenommen.

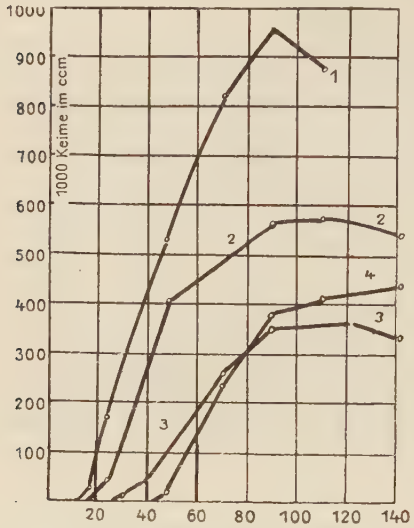

Fig. 1.

In diesem Teil der Arbeit ist der Übersichtlichkeit halber nur der erste Teil der Gesamtkurven dargestellt bis zu ihrem höchsten Punkt (d. h. bis zur Erreichung der größten Keimzahl in den Kulturen); der zweite abfallende Teil wird später für sich behandelt. Nur, wo es zum Verständnis unumgänglich notwendig ist, wurde hier schon ein Stück davon — der Beginn des Abfalles — mitgezeichnet.

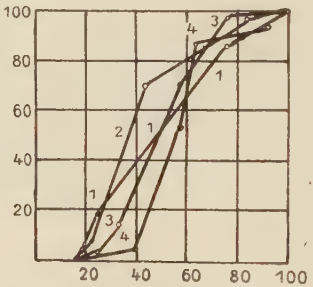

Fig. 1a.

Fig. 1. Nährlösung Bouillon. Vorbehandlung 0, 3, 8, 21 Tage. Neuimpfung mit 24 stündiger Kultur, nach Einengen und Versetzen mit frischer Nährlösung. 1. Unbehandelte Bouillon. 2. 3 Tage, 3. 8 Tage, 4. 21 Tage vorbehandeltes Bouillonfiltrat. Temp. 22°.

Fig. 1 a. Auf den nach Zeit und Maximalwert selben Endwert umgerechnete Kurven zu Fig. 1.

Figur 1 zeigt einen Versuch auf Bouillon. Es wurden 9 Kolben beimpft (zu verschiedenen Zeiten, wie oben angegeben), nach 3—8 bzw. 21 Tagen wurde ihr Inhalt filtriert, nach obiger Angabe weiter behandelt und neu beimpft, ebenso 3 Kolben mit steriler Bouillon. Wir sehen, daß die höchste Maximalzahl auf der gewöhnlichen Bouillon erreicht wird, auf dem 3 Tage alten Filtrat ist sie etwas, auf dem 8- und 21tägigen Filtrat bedeutend geringer. Auffallend ist, daß das 21 Tage alte Filtrat eine höhere Maximalzahl aufweist, als das 8 Tage alte. Es ist kaum denkbar, daß dabei ein gewisser Nährstoffmangel bei der 8tägigen Kultur eine Rolle spielt, insofern, als im 8tägigen Filtrat ein größerer Nährstoffmangel vorhanden war, als im 21tägigen; wo durch die einsetzende Autolyse der Zellen wieder neue Nährstoffmengen zur Verfügung gestanden hätten. Diese Möglichkeit wurde durch die späteren Versuche auch nicht bestätigt.

Betrachten wir die Kurven aufs weitere, so sehen wir, daß sie, von der Höhe der Maximalzahl abgesehen, noch einen Unterschied aufweisen. Je älter das Filtrat, desto länger ist die anfängliche Wachstumshemmung. Noch deutlicher ist das aus Figur 1a zu ersehen. Hier sind alle Kurven auf dieselbe Maximal- und Zeiteinheit 100 umgerechnet. Der Einfluß der Höhe des Maximalwertes und der Zeitdauer ist hier ausgeschaltet und die Kurven decken sich doch nicht. Der Hemmungsunterschied bleibt bestehen, die Kurven sind ihrem Wesen nach verändert.

Der nächste Versuch wurde zur Feststellung dessen ausgeführt, ob Schütteln irgendeinen Einfluß auf die Absonderung des Stoffes ausübt und, wenn ja, ob dieser der vergrößerten O_2-Zufuhr oder der mechanischen Wirkung des Schüttelns zuzuschreiben sei. Deshalb wurden 3 enge Reagenzgläser (geringe O_2-Zufuhr) und 6 Erlenmeyer-Kolben (große O_2-Zufuhr) mit

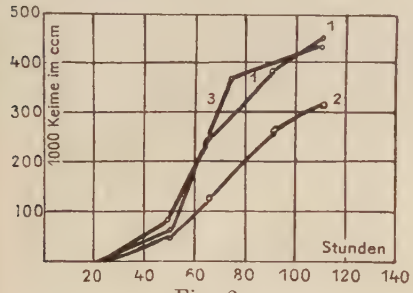

Fig. 2.

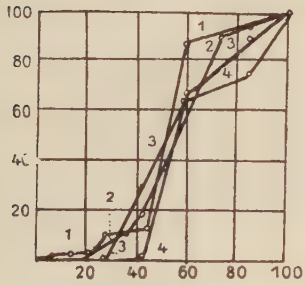

Fig. 3a.

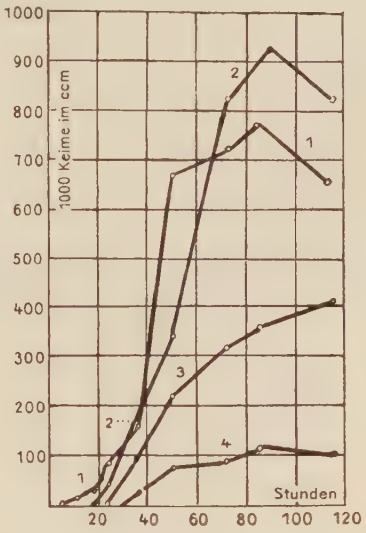

Fig. 3.

Fig. 2. Nährlösung 20 ccm Bouillon: 1. in Erlenmeier, 2. in Erlenmeier unter häufigem Schütteln, 3. im schmalen Reagenzglas. Temp. 16°.
Fig. 3. Neuimpfung mit 12 tägiger Kultur. Sonst wie Fig. 1.
Fig. 3 a. Auf denselben Endwert umgerechnete Kurven zu Fig. 3.

derseben Nährlösung beimpft, und ein Teil der Erlenmeyer-Kolben stündlich kräftig geschüttelt. Nach 5tägiger Behandlung wurde der Inhalt aller Kolben und Röhrchen filtriert und neu beimpft. Figur 2 zeigt, daß die O_2-Menge ohne Einfluß war, das Schütteln dagegen die Maximalzahl bedeutend herabsetzt, was nur auf einer größeren Loslösung des hemmenden Stoffes beruhen kann.

Die Versuche zu Figur 3 wurden unter denselben Bedingungen ausgeführt wie zu Figur 1, nur daß an Stelle einer 24stünd. eine 12 Tage alte Kultur genommen wurde. Sofort fällt ins Auge, daß hier die Maximalzahl auf dem 3 Tage alten Filtrat am höchsten ist. Die Hemmungszone dagegen — auch die relative Hemmungszone (Fig. 3a) — vergrößert sich mit dem Alter des Filtrats, ist also auf dem 3tägigen Filtrat, trotz des höherliegenden

Maximalpunktes, größer als auf gewöhnlicher Nährlösung. Wir werden später sehen, daß das seinen Grund in dem Einsetzen eines anderen Prinzips hat, vorderhand stellen wir fest, daß wir für dieses verschiedene Verhalten von jungen und alten Kulturen keine Erklärung haben. Noch etwas fiel bei diesem Versuch auf. Obwohl zur Impfung mit Hilfe einer Kapillare immer genau dieselbe Menge verwendet wurde, gingen gerade mit der gewöhnlichen Nährlösung 2 Kolben nicht an. Diesem Umstande wurde anfangs keine Bedeutung geschenkt, doch werden wir später sehen, daß ihm doch eine zukommt.

Nun wurde der Versuch nochmals wiederholt. Zur 2. Impfung wurde eine einige Wochen alte Kultur verwendet. In gewöhnlicher Nährlösung (Fig. 4) gingen von den 8 Kolben, welche zum Versuch angesetzt wurden, 3 nicht an, die anderen zeigten ein so verschiedenes Verhalten, daß keine Mittelwerte gezogen werden konnten. Bei diesen Kurven wurde auch ein

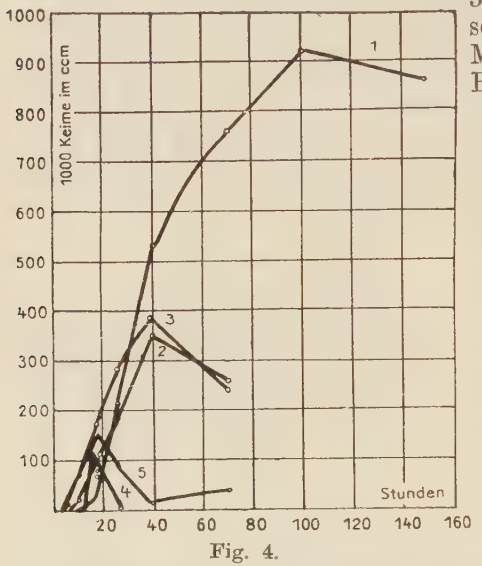

Fig. 4.

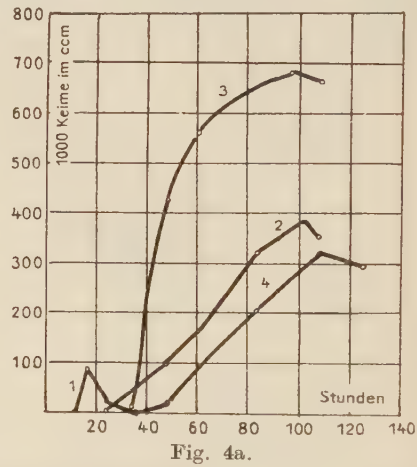

Fig. 4a.

Fig. 4. Neuimpfung mit 5 Wochen alter Kultur. 1—5 Kurven auf unbehandelter Bouillon. Temp. 22°.

Fig. 4 a. Fortsetzung von Fig. 4. 1. u. 2. auf 3 Tage vorbehandeltem, 3. auf 8 Tage, 4. auf 21 Tage vorbehandeltem Filtrat. Temp. 22°.

Stück des abfallenden Teiles mit gezeichnet. Ziehen wir vom höchsten Punkt der Kurve zur Abszisse eine Senkrechte, so entsteht zwischen diesem und dem abfallenden Ast der Kurve ein Winkel. Betrachten wir die Kurven auf diesen Winkel hin, so sehen wir, daß bei Kurve 4 und 5 dieser ganz ungewöhnlich klein ist. Das Wachstum war hier nicht nur ziemlich schwach, sondern die Keime gingen auch mit einer Geschwindigkeit, wie wir sie bei einer normalen Autolyse nie zu sehen bekommen, zugrunde. Kurve 1 dagegen zeigt wiederum ein von den anderen Kurven ganz verschiedenes Verhalten, und zwar sowohl ihrer Höhe wie der geringen Steile des Abfalles nach.

Von den Kulturen in 3tägigem Filtrat gingen ungefähr ⅔ nicht an, von den 6 mit 8tägigem und 6 mit 21tägigem Filtrat angesetzten Kolben zeigten je 5 kein Wachstum. (Sämtliche Impfungen der Versuchsreihe wurden selbstverständlich mit ein und derselben Aufschwemmung vorgenommen.) Die anderen sind in Figur 4a dargestellt. Kurve 1 zeigt ganz schwaches

Wachstum mit plötzlichem Abfall. Scheiden wir alle Kurven mit irgendwie anormalem Verhalten, also die Kurve 1, 4 und 5 der Figur 4 und die Kurve 1 der Figur 4a aus. — Auf sie kommen wir noch im V. Teil vorliegender Arbeit zurück, wo wir diese vorderhand willkürliche Ausscheidung auch begründen werden. Vergleichen wir die übriggebliebenen Kurven miteinander, also die Kurven 2 und 3 in Figur 4 (frische Nährlösung), und die Kurven 2, 3 und 4 in Figur 4a (3-, 8-, 21tägiges Filtrat), so sehen wir, daß sie sich betreffs ihrer Hemmungszone ebenso verhalten, wie die der jungen und 12tägigen Kultur: je älter das Filtrat, desto größer die Hemmung. Das beste Wachstum wurde auf dem 8tägigen Filtrat erreicht. Der eigentümliche Unterschied der darin zwischen junger und 12tägiger Kultur bestand, zeigt sich bei dieser ganz alten Kultur noch verstärkt. Eine junge Kultur zeigt also das beste

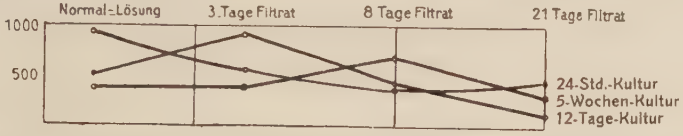

Fig. 5. Höchstwerte auf unbehandelter Nährlösung, bzw. 3—8—21 Tage vorbehandeltem Filtrat bei Impfung mit 24 stündiger, 12 tägiger, bzw. 5 Wochen alter Kultur.

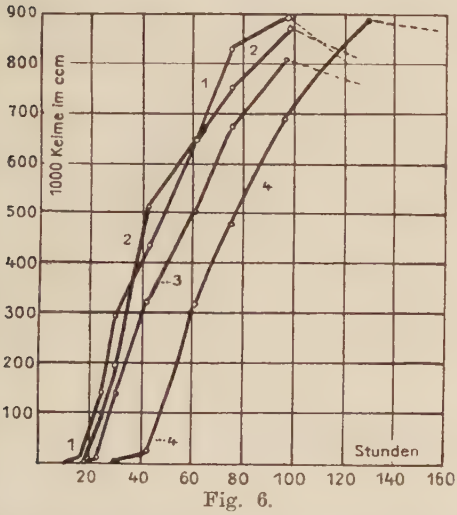

Fig. 6.

Wachstum auf frischer Nährlösung. Eine 12tägige auf 3 Tage vorbehandeltem Filtrat, wobei aber eine Anzahl Versuche nicht angehen; eine ganz alte Kultur auf 8tägigem Filtrat, wobei die meisten Versuche nicht angehen (Fig. 5).

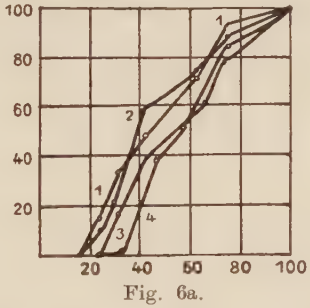

Fig. 6a.

Fig. 6. Filtrate vor Neuimpfung auf 100° erhitzt. Sonst wie Fig. 1. 1. Unbehandelte Bouillon, 2. 3 Tage, 3. 8 Tage, 4. 21 Tage vorbehandeltes Bouillonfiltrat.
Fig. 6 a. Umgerechnete Kurven zu Fig. 6.

Dieser Unterschied läßt sich mit der einfachen Annahme eines hemmenden Stoffes nicht erklären. Es ist nicht gut ersichtlich, warum ein bestimmter Stoff bei einer bestimmten Konzentration auf alte Kulturen günstig wirken soll, auf junge dagegen nicht, und warum im 1. Fall die Hemmungszone trotz der höheren Maximalzahl doch in den Filtraten eine größere ist. Es muß, wie schon darauf hingewiesen wurde, noch ein Prinzip im Spiele sein, und diese Annahme wurde durch die nachstehenden Versuche bekräftigt: Diese Versuche stellen die Wiederholung der vorigen Versuchsreihe an. Es wurden also gewöhnliche Nährlösung und mit verschieden alten Filtraten

versetzte Lösungen beimpft, nur daß die Filtrate vorher 5 Min. lang auf 100° erhitzt wurden. Da der entwicklungshemmende Stoff, wie wir im 2. Teil dieser Arbeit gesehen, thermolabil ist, wird er bei dieser Temperatur zerstört, und damit werden alle seine Einflüsse ausgeschaltet. Falls die Ursache der Verschiedenheit der Kurven wirklich nur in diesem thermolabilen Stoff läge, müßten die Kurven nach seiner Zerstörung alle das gleiche Aussehen haben. Figur 6 zeigt, daß dies nicht der Fall war. Alle Versuche zeigten ungefähr denselben Maximalwert, nur wurde dieser in den Filtraten später erreicht. Denn der anfängliche Hemmungsunterschied blieb in demselben Sinne bestehen. In frischer Nährlösung waren nach 24 Std. schon ca. 150 000 Keime vorhanden, das 21tägige Filtrat war zur selben Zeit noch vollständig klar. Auch wenn wir die Kurven auf denselben Endwert umrechnen, bleibt der relative Hemmungsunterschied bestehen (Fig. 6a). Dasselbe Verhalten zeigt eine 12tägige Kultur (Fig. 7).

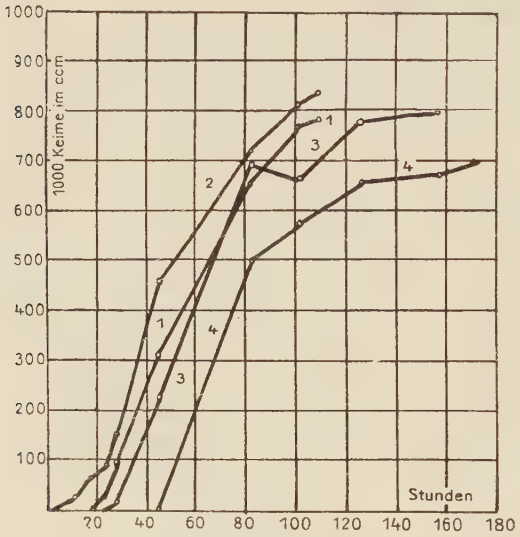

Fig. 7.

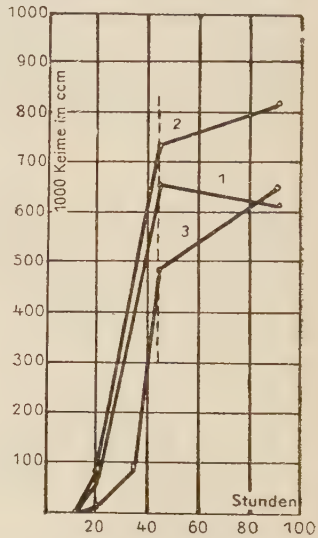

Fig. 8.

Fig. 7. Filtrate vor Neuimpfung auf 100° erhitzt, sonst wie Fig. 3. (Neuimpfung mit 12 tägiger Kultur.) 1. Unbehandelte Bouillon, 2. 3 Tage, 3. 8 Tage, 4. 21 Tage vorbehandeltes Bouillonfiltrat.

Fig. 8. Nährlösung Hefewasser. 1. Beimpft mit 24 stündiger Kultur. Nach 42 Std. Zusatz von 8 Tage vorbehandeltem, eingedickten Hefewasserfiltrat. 2. Beimpft mit 24 stündiger Kultur. Nach 42 Std. Zusatz von unbehandeltem, eingedickten Hefewasser. 3. Beimpft mit alter resistenter Kultur. Zusatz von Hefewasserfiltrat wie bei 1.

Die anfängliche Wachstumsverzögerung ist also nicht von dem entwicklungshemmenden Stoff abhängig, sondern von einem anderen Prinzip. Mit diesem Prinzip soll sich der nächste Teil der Arbeit beschäftigen; hier soll nur noch eine Frage den thermolabilen Stoff betreffend entschieden werden. Ist dieser nur entwicklungs-(vermehrungs-)hemmend oder besitzt er auch lytische Eigenschaften?

2 Erlenmeyer mit Hefewasser wurden mit einer jungen Kultur beimpft. Nach ca. 40 Std. wurden dem einen einige ccm 8tägigen, im Vakuum eingedampften Filtrates, dem anderen dieselbe Menge eingedampften Hefewassers zugesetzt (Fig. 8). Kurve 3, die nur aus Raumersparnis hier auf-

genommen wurde, wird in einem anderen Zusammenhang besprochen. (Es handelt sich um Impfung mit einer resistenten alten Kultur im Gegensatz zur Impfung von 1 und 2 mit jungen Kulturen.) In dem Versuch mit gewöhnlichem Hefewasserzusatz schreitet die Vermehrung ungehindert vorwärts, im anderen dagegen, dem das Filtrat zugesetzt wurde, hört sie sofort auf und es beginnt ein sehr langsamer Rückgang der Keimzahl. Diese läßt sich kaum als Folge einer lytischen Wirkung auffassen, weil sie sehr gering ist und die natürliche Autolyse nicht überschreitet. Die Frage, auf das lytische Vermögen des hemmenden Stoffes hin läßt sich also verneinend beantworten.

IV. Die antiproteolytische Substanz.

Um die Art des Prinzips, welches die anfängliche Wachstumshemmung verursacht, kennen zu lernen, mußte zuerst festgestellt werden, ob dieselbe Erscheinung auch auf anderen Nährlösungen als auf Bouillon auftritt. Figur 9 zeigt, daß auch auf 100° erhitzte Hefewasserfiltrate bei annähernd gleichen Optimalwerten mit dem Alter der Filtrate zunehmende absolute und relative (Fig. 9a) Anfangshemmungen zeigen. Dagegen war dieser Unterschied in Ammoniumphosphatlösung nicht bemerkbar. In den unerhitzten Filtraten

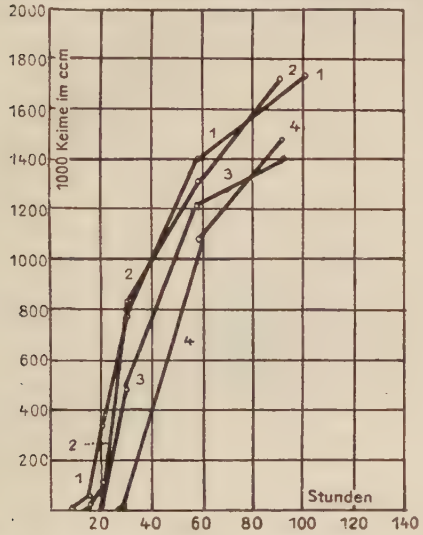

Fig. 9.

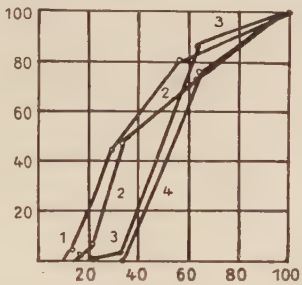

Fig. 9a.

Fig. 9. Nährlösung Hefewasser. Sonst wie Fig. 6. 1. Unbehandeltes Hefewasser, 2. 3 Tage, 3. 8 Tage, 4. 21 Tage vorbehandeltes, auf 100° erhitztes Filtrat.
Fig. 9 a. Umgerechnete Kurven zu Fig. 9.

(Fig. 10) geht zwar das Wachstum in dem 8 Tage alten Filtrat langsamer vor sich, als in dem 3 tägigen der gewöhnlichen Nährlösung, aber die Vermehrung beginnt ungefähr zur selben Zeit, nur im ersteren eben in sehr verlangsamtem und verringertem Maße. Das 21tägige Filtrat zeigt allerdings eine große Hemmung, allein hier ist das Wachstum überhaupt kaum bemerkbar, so stark scheint die Wirkung des entwicklungshemmenden Stoffes zu sein. Wurden die Filtrate zuerst erhitzt (Fig. 11), so zeigte sich überhaupt kein Hemmungsunterschied.

Dasselbe war der Fall in Asparagin- und in Ammoniumnitratlösung, mit einem Wort, in eiweißfreien Nährlösungen. Die Verminderung des Maximalwertes infolge Produktion des entwickelungshemmenden Stoffes trat in unerhitzten Filtraten eiweißfreier Nährlösungen ebenso auf, wie in denen von Bouillon und Hefewasser, aber die anfängliche Wachstumshemmung nicht.

Es muß diese also in irgendeinem Zusammenhang stehen mit dem Abbau des Eiweißes der Nährlösung. Es könnte an einen Einfluß von seiten der gebildeten Proteasen gedacht werden, oder an Spaltprodukte, die aus dem Eiweiß entstehen. Dabei müßte allerdings die ziemlich unwahrscheinliche Annahme gemacht werden, daß gerade die ersten, noch komplizierten Spaltprodukte, die bei Beginn der Spaltung entstehen, einen Einfluß ausüben.

Trypsin selbst ist auf Beginn und Stärke der Vermehrung ganz ohne Einfluß. Setzt man 4 Bouillonröhrchen an 1.) 10 ccm Bouillon ohne Zusatz, 2.) 10 ccm Bouillon + 0,1 g Pankreatin (M e r c k), 3.) 10 ccm Bouillon + 0,1 g Pankreatin sofort nach Zusatz durch Erhitzen inaktiviert, 4.) 10 ccm Bouillon + dieselbe Menge Enzym erst nach 3 Tage langem Einwirken inaktiviert,

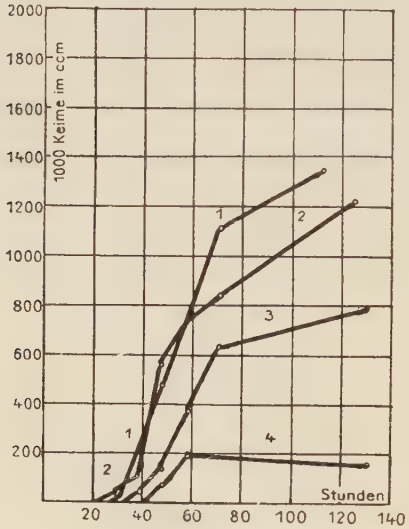

Fig. 10.

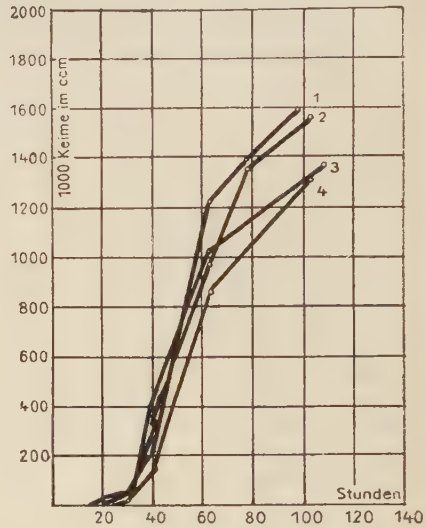

Fig. 11.

Fig. 10. Nährlösung: 0,5 Ammoniumphosphat, 0,2 $MgSO_4$, 0,05 KH_2PO_4, 2,5 Dextrose in %, Spur NaCl. Neuimpfung mit 24 stündiger Kultur. Temp. 22°. 1. Unbehandelte Nährlösung. 2. 3 Tage, 3. 8 Tage, 4. 21 Tage vorbehandeltes Filtrat.

Fig. 11. Filtrate vor Neuimpfung auf 100° erhitzt. Sonst wie Fig. 10.

so verläuft das Wachstum, nachdem alle 4 Röhrchen beimpft wurden, in allen gleich, was nebenbei auch dafür ein Beweis ist, daß P r o t e u s ebenso gut auf Bouillon wächst, wie auf durch Trypsin zersetzter Bouillon, wo nur mehr Eiweißabbauprodukte vorhanden sind.

Die Proteasen selbst können also nicht die Ursache von Wachstumsunterschieden sein. Es bleibt aber die Tatsache, daß dieselbe Erscheinung auf eiweißhaltiger Nährlösung auftrat und auf eiweißfreier nicht; irgendein Zusammenhang mußte also bestehen. Deshalb wurden Gelatineverflüssigungs-Versuche angestellt. Die Gelatine wurde statt in Wasser in Nährlösung bzw. in den vorbehandelten Filtraten aufgelöst, zum Erstarren gebracht und dann mit Enzymlösung überschichtet. Die Versuchsanordnung war folgende:

Es wurde eine 10proz. Gelatinelösung mit etwas Karbolsäurezusatz bereitet. 2 bis 3 ccm dieser Lösung wurden in graduierte Röhrchen gefüllt und noch in flüssigem Zustand mit genau derselben Menge unerhitzten, 5 Min. auf 100° erhitzten bzw. 2 Std.

im Autoklaven auf 140° erhitzten Filtrates vermengt und dann zum Erstarren gebracht. Als Kontrolle diente an Stelle von Filtrat gewöhnliche Bouillon bzw. Ammoniumphosphatlösung.

Sowohl die Filtrate wie die Kontrollnährlösung wurden vorher im Vakuum bei niedriger Temperatur auf $^1/_4$ ihrer ursprünglichen Menge eingedickt. Die Alkalität wurde mit Hilfe der Indikatoren-Methode in allen Röhrchen genau gleichgestellt. Die erstarrte Gelatine wurde mit 1 ccm Trypsinlösung überschichtet. Diese wurde durch Auflösen von 1 g Pankreatin in 100 ccm schwach alkalischer Kochsalzlösung und Filtrieren der Lösung gewonnen.

Tabelle 12.

8 Tage vorbehandeltes Bouillonfiltrat unerhitzt, 5 Min. gekocht bzw. 2 Std. im Autoklaven bei 140° gekocht. Als Kontrolle gewöhnliche und im Autoklaven behandelte Bouillon. Filtrat bzw. Bouillon mit der jeweils gleichen Menge 10proz. Gelatine vermengt. Reaktion 7,5 pH. Überschichten der erstarrten Gelatine mit 1 ccm 1proz. Trypsinlösung. 2 Tropfen Toluolzusatz. Temp. 22°.

	Unverdaute Gelatine in ccm nach Std.					
	0	24	48	72	96	Verdaut
Bouillon + Gelatine	4,3	3,8	3,5	3,2	3	1,3
Autoklaven „ + „	4,3	3,9	3,6	3,3	3,2	1,1
Filtrat + „	4,1	3,3	2,6	2,2	1,9	2,2
gekochtes „ + „	4,5	4,2	3,9	3,7	3,6	0,9
Autoklaven „ + „	4,2	3,6	2,8	2,5	2,3	1,9

Den Versuchsverlauf zeigt Tabelle 12. In der mit auf 100° erhitztem Filtrat versetzten Gelatine war die Verflüssigung eine bedeutend kleinere, als in allen anderen Röhrchen. Sie war auch kleiner, als in der Bouillon-Kontrolle, obwohl das Filtrat nur weniger Eiweiß enthalten kann, als die noch nicht zersetzte Bouillon. In dem auf 100° erhitzten Filtrat befindet sich also eine antiproteolytische Substanz. Diese scheint in dem unbehandelten Filtrat an die von den Bakterien ausgeschiedene Protease gebunden zu sein und wird bei der Zerstörung dieser Protease durch das Erhitzen frei. Durch lang andauerndes Erhitzen im Autoklaven wird auch sie zerstört. Die Differenz zwischen der Verflüssigung im autoklavierten und der im gekochten Filtrat zeigt also direkt die antiproteolytische Wirksamkeit des Filtrates an.

Es muß hier erwähnt werden, daß die Unterschiede nicht immer so stark waren. Es gelang die Zerstörung der antiproteolytischen Substanz im Autoklaven nicht immer. Am sichersten wurde sie zerstört, wenn das Filtrat stärker sauer oder alkalisch war, doch konnte diese Methode wegen entstehender Ungenauigkeiten in der H-Ionenkonzentration nicht angewendet werden. Jedenfalls mußte die Behandlung im Autoklaven mindestens 2 Std. bei 140° dauern. 8 Std. langes Kochen in zugeschmolzenen Röhrchen brachte keine sicheren Resultate.

Im 21 Tage vorbehandeltem Bouillonfiltrat ist die antiproteolytische Wirksamkeit noch stärker als im 8tägigen.

Tabelle 13.

Wie Tabelle 12, aber 21 Tage vorbehandeltes Bouillonfiltrat.

	Unverdaute Gelatine in ccm nach Tagen						
	0	1	2	3	4	5	Verdaut
Bouillon + Gelatine .	6,2	5,6	4,9	4,3	3,8	3,6	2,6
Autoklaven „ + „ .	6,2	5,6	5	4,4	3,9	3,7	2,5
Unerhitztes Filtrat + „ .	6,1	5,9	5,5	5,4	5,1	4,9	1,2
Autoklaven- „ + „ .	6,2	5,4	4,6	3,5	3	2,8	3,4

In den Leibern der Bakterien ist die antiproteolytische Substanz auch nachzuweisen. Eine 8 Tage alte Bouillonkultur wurde durch de Haën-Membran filtriert. Die Keime wurden von der Membran abgekratzt, mit etwas Sand verrieben, im Wasser aufgeschwemmt und mit geringem Chloroformzusatz 48 Std. lang bei 32° stehen gelassen. Dann wurde die Aufschwemmung filtriert und das Filtrat wie sonst behandelt.

Das Röhrchen mit unerhitzter Aufschwemmung mußte verworfen werden, da es infolge der starken proteolytischen Wirksamkeit der autolysierenden Keime sofort verflüssigt wurde. In der auf 100° erhitzten Aufschwemmung war die Verflüssigung nur ⅓ von der in der Bouillonkontrolle (obwohl diese beiden Ziffern nicht direkt vergleichbar sind) und nicht einmal ⅓ von der in der autoklavierten Aufschwemmung.

Tabelle 14.

Filtrierte Bakterienaufschwemmung einer 8 Tage alten Bouillonkultur bei 100° bzw. im Autoklaven behandelt, als Kontrolle Bouillon. Sonst wie Tab. 12.

	Unverdaute Gelatine in ccm nach Tagen								
	0	1	2	3	4	5	6	7	Verdaut
Bouillon + Gelatine . . .	5	4,5	3,9	3,5	3	2,6	2,3	2	3
Autoklaven- „ + „	5	4,4	3,9	3,6	3	2,5	2,2	2	3
Auf 100° erhitzte Bakterienaufschwemmung + Gelatine	5	4,6	4,5	4,5	4,3	4	4	4	1
Autoklavierte Bakterienaufschwemmung + Gelatine	5	4	3,2	2,7	2,3	1,9	1,6	1,5	3,5

Auf eiweißhaltiger Nährlösung bildet Proteus also eine antiproteolytische Substanz, die so im Substrat wie in den Leibern der Bazillen nachzuweisen ist. Wie verhält es sich in eiweißfreier Nährlösung?

In eiweißfreier Nährlösung traten, wie wir gesehen, die Hemmungsunterschiede nicht auf. Es wurden Versuche mit verschieden alten Filtraten von Ammoniumphosphat angestellt, deren Ergebnis es war, daß 1—5 Tage vorbehandelte Filtrate auch bei sehr starker Eindickung keine antiproteolytische Wirksamkeit zeigen; am 5.—7. Tage tritt sie dann auf, aber in geringerem Maße als in eiweißhaltiger Nährlösung. In dem Substrat ist sie also nur nachzuweisen, wenn schon eine Autolyse der Zellen darin stattgefunden hat; ausgeschieden wird sie nicht, nur endozellular ist sie vorhanden. Eine auf die vorhin beschriebene Art gewonnene Aufschwemmung von Bakterien, die auf Ammoniumphosphatlösung gewachsen sind, zeigt eine erhebliche antiproteolytische Wirksamkeit (Tab. 15).

Tabelle 15.

Filtrierte Bakterienaufschwemmung einer 8 Tage alten Ammoniumphosphatlösungkultur. Sonst wie Tab. 12 u. 14.

	Unverdaute Gelatine in ccm nach Tagen							
	0	1	2	3	4	5	6	Verdaut
Ammonium-Phosphatlösung + Gelatine . .	5	4,1	3,3	2,6	2	1,5	1	4
Autoklaven Ammonium-Phosphatlösung + Gelatine	5	3,9	3,3	2,5	1,9	1,3	0,9	4,1
Auf 100° erhitzte Bakterienaufschwemmung	5	4,6	4,3	3,9	3,7	3,6	3,5	1,5
Autoklavierte Bakterienaufschwemmung	5	4,3	3,7	3	2,4	2,3	2	2

Zwischen der antiproteolytischen Wirksamkeit eines Filtrates und der anfänglichen Wachstumshemmung der auf ihm wachsenden Bakterien besteht also eine merkwürdige Übereinstimmung. Je länger das Fitrat vorbehandelt wurde, desto größer die antiproteolytische Wirksamkeit und desto länger die Wachstumsverzögerung, falls es sich um eine eiweißhaltige Lösung handelt. Auf eiweißfreier Lösung ist weder in der Hemmungszone der Kurven, noch in dem Grade der Verflüssigung der Gelatine ein Unterschied zu sehen.

Es blieb noch ein Versuch übrig: Verschwindet der Unterschied in der Wachstumshemmung zwischen gewöhnlicher Nährlösung und Filtrat, der vorhanden war, wenn das Filtrat nur auf 100° erhitzt wurde, beim Erhitzen im Autoklaven? Figur 12 zeigt, daß er verschwindet. In eiweißfreier Nährlösung wurde dieser Versuch — da in dieser die Hemmung an und für sich nicht auftrat — gar nicht angestellt.

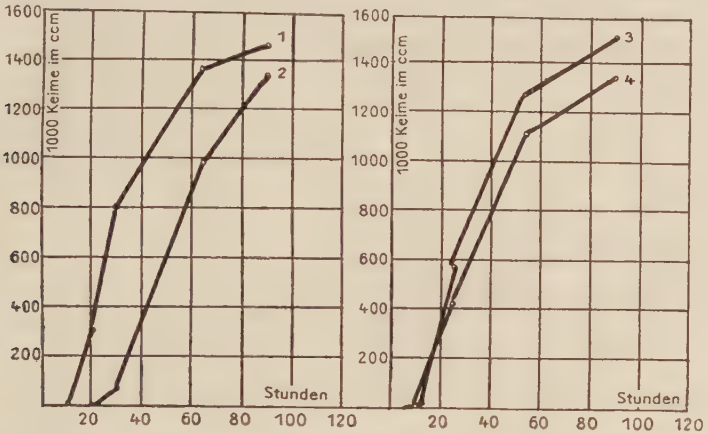

Fig. 12. 1. 50 ccm Hefewasser, 2. 50 ccm 8 Tage vorbehandeltes Hefewasserfiltrat, 3. wie 1; 2 Std. im Autoklaven auf 140° erhitzt, 4. wie 2; 2 Std. im Autoklaven auf 140° erhitzt.

Weiter war noch die Frage von Interesse, ob nicht eine gewisse Spezifizität besteht zwischen antiproteolytischer Substanz und Bakterien-Protease. Es wurde ein auf 100° bzw. im Autoklaven erhitztes Filtrat einerseits mit Trypsinlösung, anderseits mit Bakterienaufschwemmung überschichtet (Tab. 16).

Tabelle 16.

Bouillonfiltrate, Temperatur usw. wie Tab. 12.

	Verdaut in ccm
1. Gelatine + autoklaviertes Bouillionfiltrat überschichtet mit Trypsin	3
2. „ + „ „ „ „ Bakt.-Aufschw.	5
3. „ + auf 100° erhitztes Filtrat überschichtet mit Trypsin	1
4. „ + auf 100° „ „ „ „ Bakt. Aufschw.	1,1

(Die Bakterienaufschwemmung dient als spezifisches Trypsinpräparat.)

Die Werte sind natürlich nicht direkt vergleichbar, nur ihr Verhältnis zueinander.

$$\frac{\text{Autoklaven-Filtrat + Bakt.-Aufschw.}}{\text{Autoklaven-Filtrat + Trypsin}} = 1{,}66$$

$$\frac{100^0 \text{ — Filtrat + Bakt.-Aufschw.}}{100^0 \text{ — Filtrat + Trypsin}} = 1{,}1$$

Im ersteren Fall war die proteolytische Wirksamkeit der Bakterien-Aufschwemmung 1,66mal stärker als die der Trypsinlösung, in letzterem Falle nur 1,06mal. Es wurde also verhältnismäßig mehr Bakterien-Protease durch die Antiprotease gebunden als Pankreatin.

Ob und wie sich die Wirksamkeit dieser antiproteolytischen Substanz erklären läßt, davon wird später die Rede sein. Im folgenden soll der 2. abfallende Teil der Kurven behandelt werden, der in Abschnitt III der Übersichtlichkeit halber nicht berücksichtigt wurde.

V. Der zweite Teil der Keimzahlkurve.

Verfolgen wir die Keimzahl an der Hand der Kurve weiter, so sehen wir, daß sie nach Erreichung des höchsten Punktes langsam wieder abfällt. Dieser Abfall erreicht aber nicht den Nullpunkt; nach einiger Zeit kommt wieder ein Steigen der Keimzahl, dem dann nochmals ein Abfall evtl. mit einem

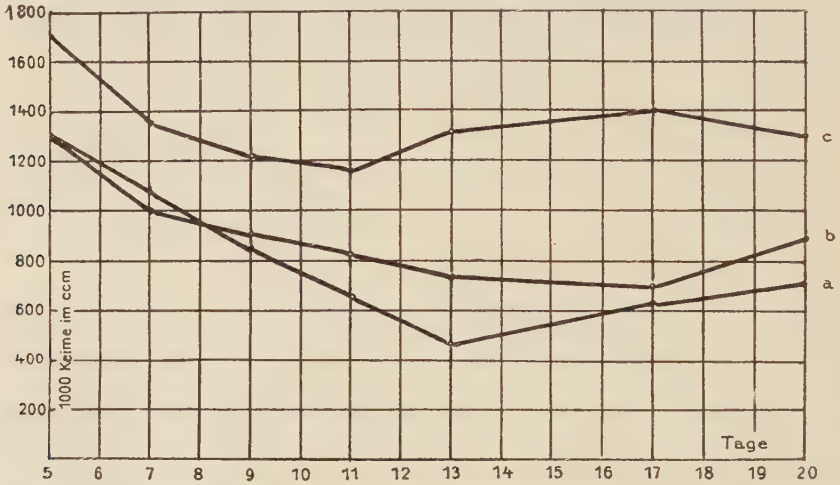

Fig. 13. Der zweite abfallende Teil einer Keimzahlkurve. a) u. b) Auf Ammoniumphosphatlösung, c) auf Hefewasser. (Impfung mit 24 stündiger Kultur.) Temp. 22°.

neuen Aufstieg folgt usw. Auch in einer 2—3 Monate alten Kultur finden sich noch lebende Keime, wieder ein Hinweis darauf, wie gering, praktisch genommen, die Rolle der Nährstofferschöpfung ist. Die Leiber der toten Zellen dienen immer wieder als neue Stickstoffquelle, und ist die Kohlenstoffquelle erschöpft, so dient das Eiweiß und seine Abbauprodukte auch als solche.

Das Charakteristischste in diesem 2. Teil der Kurve ist der plötzliche Abfall nach dem Maximalpunkt. Wäre der Abfall eine Folge der Nährstofferschöpfung, so würde sich die Kurve langsam zum Maximalpunkt hinauf und von dort wieder hinabbiegen. Das ist aber nicht der Fall. Der Winkel, den die durch den Maximalpunkt zur Abszisse gezogene Senkrechte mit dem abfallenden Ast einschließt, ist ein ziemlich kleiner. Wir wollen nun die Größe dieses Winkels unter den bisherigen Bedingungen betrachten. In gewöhnlicher Ammonium-Phosphatlösung faßt der Winkel beiläufig 50° (Fig. 13, 24stünd. Kultur), in Hefewasser vielleicht etwas weniger.

Anders dagegen in den vorbehandelten Kulturfiltraten. Je älter das Filtrat, desto größer der Winkel (Fig. 14), desto weniger steil also der Abfall.

Und dieses ebenso unabhängig von der Höhe des Maximalpunktes, wie die anfängliche Hemmungsverzögerung unabhängig davon war. Figur 14 stellt die Fortsetzung von Figur 6a dar (auf 100° erhitzte Filtrate, Kurven auf denselben Endwert umgerechnet). Als Nährlösung diente Bouillon. In gewöhnlicher Bouillon ist der Abfall ungefähr so wie im Hefewasser, im 21 Tage alten Bouillonfiltrat kaum bemerkbar. Später natürlich erfolgt auch hier ein Abfall, aber uns interessiert hier nur der Winkel beim Maximalpunkt.

Es scheint also, als ob die Regel gelte: Je größer die anfängliche Wachstumshemmung, desto flacher der Abfall im 2. Teil der Kurve, worunter — das soll ausdrücklich betont werden — kein kausaler Zusammenhang zu verstehen ist.

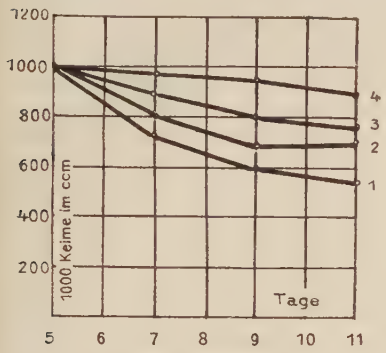

Fig. 14.

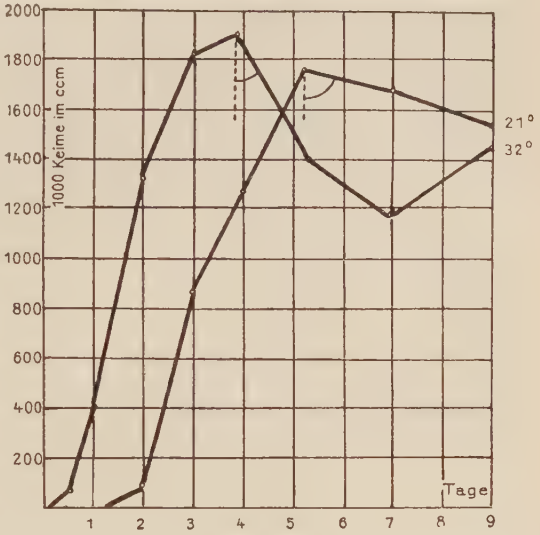

Fig. 15.

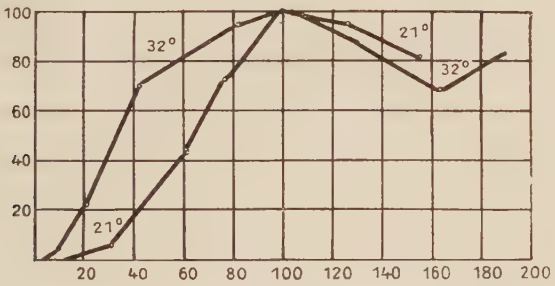

Fig. 15a.

Fig. 14. Fortsetzung von Fig. 6 a. Zweiter Teil der umgerechneten Keimzahlkurven. 1. Auf unbehandelter Bouillon, 2. auf 3 Tage, 3. auf 8 Tage, 4. auf 21 Tage vorbehandeltem, auf 100° erhitztem Bouillonfiltrat.

Fig. 15. Kurvenverlauf auf Hefewasser bei verschiedener Temp. Impfung mit 24 stündiger Kultur.

Fig. 15 a. Auf denselben Höchstwert umgerechnete Kurven zu Fig. 15.

Dieses Zusammentreffen ist auch vorhanden, wenn wir das Wachstum unter sonst gleichen Bedingungen bei verschiedenen Temperaturen vergleichen. Die 2 Kurven in Figur 15 (und 15a) stellen das Wachstum bei 21° und bei 32° dar. Bei 32° beginnt das Wachstum früher — der Abfall der Kurve ist ein steilerer —, bei 21° verzögert sich der Wachstumsbeginn, — der Abfall der Kurve geht langsamer vor sich.

Hängt nun dieser verschieden starke Abfall auch mit der Substanz zusammen, deren antiproteolytische Wirksamkeit wir in den Gelatine-Verflüssigungsversuchen kennengelernt haben? Wenn ja, so muß er sich in Filtraten, die im Autoklaven erhitzt worden sind, deren antiproteolytische Wirksamkeit also vernichtet worden ist, ausgleichen. Dies war auch tatsächlich der Fall (Fig. 16.)

Wir haben gesehen, daß die anfänglichen Wachstumsunterschiede in eiweißfreier Nährlösung nicht auftreten. Die Gelatine-Verflüssigungsversuche haben ergeben, daß in eine eiweißfreie Lösung keine antiproteolytische Substanz ausgeschieden wird. Figur 17 zeigt, daß die Abfallsunterschiede auch in eiweißfreien Nährlösungen bzw. ihren vorbehandelten Filtraten entstehen. Daraus folgt, daß der scheinbare Zusammenhang, den wir in eiweißhaltigen Lösungen zwischen Wachstumsverzögerung und Abfallstelle gesehen haben, kein kausaler sein kann. Der einzige Unterschied zwischen eiweißhaltigen und eiweißfreien Lösungen besteht darin, daß bei letzteren erst in 8—21 Tage vorbehandelten Filtraten eine deutliche Abweichung der Abfallstärke von der in frischer Nährlösung nachzuweisen ist, während in eiweißhaltigen ein mit der Dauer der Vorbehandlung sich stufenweise verflachender Abfall zu verfolgen ist. Im Autoklaven behandelte Filtrate zeigen auch in diesem Falle keine Unterschiede untereinander.

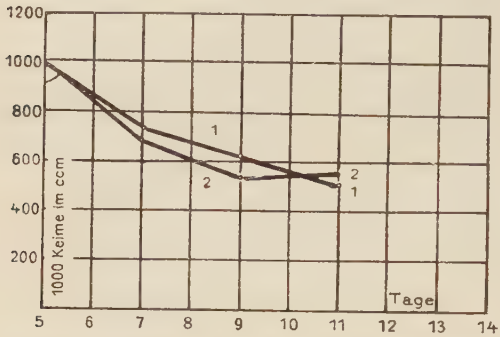

Fig. 16. Der zweite abfallende Teil der Kurven. 1. Auf Bouillon, 2. auf 8 Tage vorbehandeltem, im Autoklaven erhitztem Bouillonfiltrat. (Auf denselben Endwert [Höchstwert] umgerechnet.) Temp. 22°.

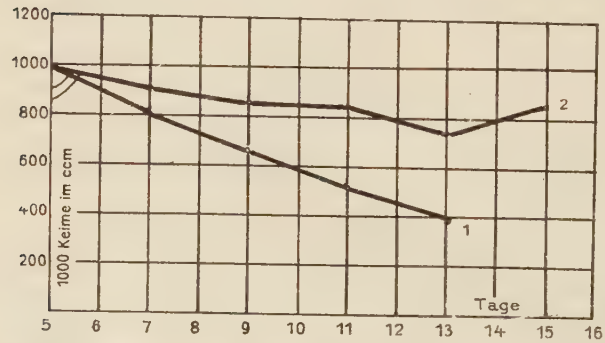

Fig. 17. Der zweite Teil der Kurven auf 1. unvorbehandelter Ammoniumphosphatlösung, 2. auf 21 Tage vorbehandeltem, auf 100° erhitztem Filtrat. Auf denselben Höchstwert umgerechnet.

VI. Diskussion.

Wir haben im vorhergehenden öfters von der Möglichkeit eines Zusammenhanges zwischen Anfang und abfallendem Teil der Keimzahlkurve gesprochen. Damit haben wir gleichzeitig die Annahme ausgesprochen, daß die Zellen, welche bei Beginn des Wachstums vorhanden sind, auf spätere Zellen, die mit ihnen weder in zeitlichem noch in räumlichem Zusammenhange stehen und durch viele Generationen von ihnen getrennt sind, irgendeinen Einfluß ausüben. Mit anderen Worten, daß zwischen Zellen einer Kultur

nur dadurch, daß sie eben zur selben Kulturgemeinschaft gehören, Beziehungen bestehen. Sind wir zu dieser Annahme berechtigt?

Betrachten wir die im Laufe der Arbeit dargestellten Kurven, und zwar diejenigen, welche das Wachstum in gewöhnlicher, frischer Nährlösung, aber nicht in vorbehandelten Filtraten, darstellen, so fällt an allen ein schon öfters erwähntes gemeinsames Merkmal auf: daß der höchste Punkt — die höchste Keimzahl — ziemlich steil und übergangslos erreicht wird und die Kurve dann in dieser Höhe nicht stehen bleibt, sondern wiederum ziemlich steil abfällt. Dasselbe Spiel kann sich dann evtl. nochmals wiederholen.

Über die Ursache, die die Vermehrung zum Stillstand bringt, wurde schon in den ersten Abschnitten gesprochen. Dort wurde auch schon bewiesen, daß der Nahrungsmangel und die Bildung der gewöhnlichen thermostabilen Stoffwechselprodukte, wenigstens was die vorbehandelten Filtrate anbetrifft, nur in geringem Maße daran beteiligt sein können. Vielmehr kommt die Einwirkung eines thermolabilen, entwicklungshemmenden Stoffes dabei zur Geltung. — Was immer wir aber als Grund der Vermehrungseinstellung ansehen, können wir — falls wir ihn in Beeinflussung von seiten bestimmter Stoffe sehen — 2 Möglichkeiten annehmen: 1. Die Vermehrung hört auf aus Mangel an nötigen Stoffen; 2. die Vermehrung hört auf infolge zu starker Konzentration entwicklungshemmender Stoffe. Die 3. Möglichkeit, daß die Zellen ihre Vermehrungsfähigkeit eingebüßt haben, fällt weg, da sie sich in neuer Nährlösung wieder vermehren. Keine dieser beiden Möglichkeiten erklärt das ziemlich plötzliche Aufhören der Vermehrung und den gleich darauf folgenden steilen Abfall. Vielmehr wäre in beiden Fällen ein allmähliches, immer langsamer werdendes Ansteigen und darauf ein ganz allmähliches, immer steileres Abfallen zu erwarten. Denn wenn wir jede Zelle als eine von den anderen ganz unabhängige Einheit betrachten, so müssen wir annehmen, daß die Nährstoffabnahme oder die Bildung entwicklungshemmender Stoffe der Zahl der Zellen proportional ist. Je mehr Zellen entstehen, desto mehr wird z. B. von dem entwicklungshemmenden Stoff gebildet. Das hat zur Folge, daß immer weniger und weniger Zellen sich teilen, immer weniger von dem hemmenden Stoff entsteht, bis endlich die Zahl der neu entstandenen Zellen so klein wird, daß sie durch die Zahl der abgestorbenen überwogen wird. Wenn wir aber sehen, daß die Vermehrung unabhängig vom hemmenden Stoff fortschreitet, so ist nur die eine Annahme möglich, daß die Vermehrung nicht oder nicht direkt einen günstigen Allgemeinzustand der Zelle beweist. Die Zahl der Zellen zu einer bestimmten Zeit ist noch kein Beweis für das allgemeine Gedeihen der Zellen der Kultur. Es kann die Vermehrung auch erfolgen, trotzdem die Lebensbedingungen für die Einzelzelle dadurch verschlechtert werden. Wir werden diesen Satz noch später bei den Versuchen mit alten Kulturen bestätigt finden, hier sei als Beispiel nur wieder an das d'Herellesche Phänomen erinnert, bei welchem die Zahl der Keime in einer Kultur trotz Vorhandensein eines schädlichen Prinzips zu einer bestimmten Zeit eine sehr erhebliche sein kann, um dann nach einigen Stunden auf Null zu sinken.

Die Vermehrung ist also nicht von Fall zu Fall die Folge eines bestimmten Zustandes der Zelle. Sie ist vielmehr von dem Energierhythmus der ganzen Kultur und somit besonders von ihrem frühesten Stadium abhängig. Die Vermehrung schreitet steil vor, trotzdem die Zellen dadurch in einen ungünstigeren Allgemeinzustand geraten, weil sie durch diesen Rhythmus selbst bedingt wird. So lange, bis die Konzentration des hemmenden

Stoffes so groß wird, daß sie die Vermehrungsfunktion physiologisch ausschließt, oder bis ein anderes Prinzip eingreift und die Vermehrung zum Sistieren bringt. Das soll aber erst im nächsten Abschnitt ausführlicher besprochen werden.

Von dem Moment an, wo die Vermehrung aufgehört hat, stehen die Zellen plötzlich vor einem ganz veränderten Gleichgewichtszustand. (Das alles bezieht sich natürlich auf die überwiegende Mehrzahl der Zellen, denn es gibt auch schon in ganz jungen Kulturen Zellen, die sich nicht mehr vermehren.) All die Energie- und Stoffmenge, die zu der Bildung von 2 Zellen aus 1 nötig gewesen wäre, staut sich auf. Die Zellen müssen diese Gleichgewichtsstörung überwinden und von der Art, wie sie das tun, hängt der 2. Teil der Kurve ab.

Kehren wir nun zu unseren Versuchen zurück. Wir haben gesehen, daß durch B. Proteus im Laufe seines Wachstums eine antiproteolytische Substanz gebildet wird, welche in eiweißhaltigen Nährlösungen zu Beginn der Vermehrung eine Hemmungsvergrößerung verursacht und nach dem Aufhören der Vermehrung die Abfallsteile der Keimzahl verringert[1]). In eiweißfreien Nährlösungen ist sie auf den Beginn des Wachstums ohne Einfluß. Wie läßt sich nun ihre Wirksamkeit im Zellkörper erklären? Darüber lassen sich natürlich nur Annahmen machen.

Daraus, daß die antiproteolytische Substanz den Abfall der Kurve im 2. Teil verringert, läßt sich schließen, daß sie vielleicht mit den Proteasen der Zellen eine Bindung eingeht und sie dadurch hindert, das Eiweiß der Zelle anzugreifen. Sie verhindert also die Autolyse. Daß es eine antiproteolytisch wirksame Substanz geben muß, war von vornherein wahrscheinlich. Denn nur dadurch ließ sich der Widerstand lebender Zellen gegen die Selbstauflösung und gegen die Auflösung von seiten fremder Fermente erklären. Buchner, Haehn und Schifferdecker wiesen in einem anderen Zusammenhang in der Hefe eine Antiprotease nach.

Die Gefahr der Selbstauflösung ist naturgemäß in 2 Stadien der Kultur eine besonders große: 1. gleich nach der Neuimpfung. Die Zellen, die in eine eiweißreiche Nährlösung gekommen sind, bilden plötzlich große Mengen von Proteasen, ob unter dem Einfluß des Eiweißes allein, oder ob die Bildung von Ferment selbst auch als neuer Reiz dient, mag dahingestellt bleiben. Wir kennen weder zwischen Eiweiß und Ferment, noch zwischen schon gebildetem und noch zu bildendem Ferment eine konstante Proportionalität. Es kommt z. B. auch zur Bildung von Ferment in eiweißfreier Nährlösung (vgl. z. B. Kruse), aber in so verringertem Maße, daß wir immerhin von einem Zusammenhang zwischen Eiweiß und Fermentbildung sprechen können. 2. Wird die Gefahr der Selbstauflösung groß sein nach dem Sistieren der Vermehrung. Hier beginnt tatsächlich eine aus der Kurve ersichtliche starke Selbstauflösung. In eiweißfreier Nährlösung fällt der 1. von diesen beiden Fällen weg, der 2. dagegen bleibt bestehen.

Die Funktion der antiproteolytischen Substanz wäre danach so verstellbar, daß die gebildete Protease zur Ablenkung von dem Zelleiweiß an die Antiprotease gebunden und mit dieser ausgestoßen wird. Aus dieser Bindung würde dann die Antiprotease durch das Eiweiß verdrängt. Das erfordert natürlich Zeit und setzt die Zellen einer Verlangsamung der Nahrungs-

[1]) Wenn oben S. 21 gesagt wurde, daß diese beiden Erscheinungen in keinem kausalen Zusammenhange stehen, so schließt das natürlich nicht aus, daß sie beide von einer gemeinschaftlichen Ursache bedingt sind.

aufnahme aus. (Die schwächeren Keime werden dabei vielleicht zugrunde gehen.) Kommt die Zelle in ein antiproteasehaltiges Filtrat, so muß die anfängliche Entwicklungsverzögerung eine noch größere sein. Nach dem — wie wir gesehen haben — ziemlich plötzlichen Aufhören der Vermehrung stehen die Zellen infolge Anstauung von Ferment einer vergrößerten Auflösungsgefahr gegenüber. Je mehr Antiprotease in den Zellen oder im Nährsubstrat vorhanden ist, desto mehr Protease wird abgelenkt, und desto geringer wird die Auflösung.

Im folgenden soll versucht werden, die Ergebnisse, die wir in den Versuchen mit alten Kulturen gefunden haben, mit Hilfe dieser Erklärung zu deuten und die Erwägungen, die daraus folgen, auf weitere Versuchsergebnisse anzuwenden.

VII. Versuche mit alten Kulturen.

Wenn wir zwischen junger und alter Kultur einen prinzipiellen Unterschied machen wollen, so müssen wir als Grenze den Zeitpunkt ansehen, bei welchem die höchste Keimzahl erreicht wird. Im abfallenden Teil der Kurve haben wir also schon eine alte Kultur vor uns. Das wichtigste Charakteristikum einer alten Kultur ist, daß sie nie ein einheitliches Material darstellt. Es verlaufen die verschiedensten Vorgänge nebeneinander, Vermehrung und Absterben, Resistenzgewinnung und Sensibilisierung, Anpassung und Auslese. So z. B. werden die Zellen, die mehr antiproteolytische Substanz besitzen, oder aus irgendeinem anderen Grunde widerstandsfähiger sind, der Autolyse besser widerstehen als die anderen. Ebenso werden sich aber die Zellen nach den verschiedensten anderen Eigenschaften sondern. Es werden sich z. B. solche finden, die vorwiegend das noch vorhandene Eiweiß und den Leib der abgestorbenen Bakterien angreifen, andere wieder werden besonders die Eiweißabbauprodukte als N-Quelle benutzen. Wenn wir in Gelatine eine Stichkultur von Proteus anlegen, so sehen wir nach einiger Zeit, wenn die Gelatine schon 1—2 ccm weit verflüssigt ist, auf der noch nicht verflüssigten Gelatine einen dicken Rasen von Bakterien, welche die Gelatine unter anaëroben Bedingungen weiter verflüssigen. Die verflüssigte Gelatine selbst ist vollständig klar. Oben darauf ist wieder eine Haut von Bakterien, die auf die Eiweißspaltung verzichtet haben und unter aëroben Verhältnissen die von der unteren Bakterienschicht gebildeten Spaltprodukte als N-Quelle benutzen. Diese Anpassung muß natürlich keine erbliche sein, doch gelang es durch wiederholte Züchtung auf einer verflüssigten Gelatine, eine Kultur zu gewinnen, die ihr Verflüssigungsvermögen vollständig eingebüßt hatte. Dies aber nur nebenbei.

Verfolgen wir eine Schrägagarkultur, so sehen wir, daß nach einiger Zeit auf dem anfangs gleichmäßigen Rasen, der nunmehr eine mehr runzelige, uneinheitliche Beschaffenheit hat, deutlich umgrenzte frische Kolonien, die „Sekundär-Kolonien“ entstehen, wie das ja allgemein bekannt ist. Diese Kolonien sind im allgemeinen als resistent zu bezeichnen, und zwar als resistent gegen die gerade vorhandenen schädlichen Einflüsse. Sie bilden sich zu einer Zeit, wo die anderen ihre Vermehrung schon eingestellt haben. In flüssigen Substraten entspricht ihnen das Wiederansteigen der Kurve, nachdem sie schon einmal abgefallen war, wie wir es in Figur 13 oder z. B. in der 30°-Kurve von Figur 15 gesehen haben. Sie müßten also unter anderem auch gegen den entwicklungshemmenden Stoff resistent sein, falls wir nicht annehmen wollen, daß dieser auch an die toten Zellen gebunden, oder schon innerhalb so kurzer Zeit zerstört worden ist.

Dieses Wiederansteigen der Kurve, überhaupt die Form des ganzen 2. Teiles, ist nie regelmäßig, weil hier eben die verschiedensten Einflüsse zur Geltung kommen. Nur die Art des Abfalles nach dem Maximalpunkt ist etwas, was, wie wir gesehen haben, der Versuchsmethodik unterliegt.

Kehren wir nun zu den Versuchen zurück, die mit einer alten Kultur in gewöhnlicher Nährlösung und in verschieden lange vorbehandelten Filtraten angestellt wurden: Wir haben damals (bei der Untersuchung auf den hemmenden Stoff hin) die Kurven 1, 4 und 5 der Figur 4 und die Kurve 1 der Figur 4a außer acht gelassen mit der Begründung, daß hier ein anderes Prinzip eingreifen muß, da eine ganz plötzliche Lyse einsetzt. Mit Ausnahme der Kurve 1 in Figur 4. In dieser können wir gleich den resistenten Typ erkennen, der auf einem Schrägagarrasen zur Bildung von Sekundärkolonien führt. Kurve 4 und 5 dagegen haben ihre Vermehrung nach ganz kurzer Zeit eingestellt und es setzte eine Lyse ein, welche bei Kurve 5 (Fig. 4) fast sämtliche Keime vernichtete und das Substrat von Kurve 4 überhaupt steril machte. 3 Kulturen in gewöhnlicher Nährlösung kamen gar nicht zur Entwicklung.

Die Keime der alten Kultur müssen also ein voneinander verschiedenes Verhalten zeigen. Es sind folgende Möglichkeiten vorhanden: 1. Sie haben die Fähigkeit zur Bildung der antiproteolytischen Substanz ganz oder teilweise eingebüßt. 2. Irgendwelche andere Faktoren ihrer Lebenskraft sind mehr oder weniger geschwächt. Daß dies der Fall ist, zeigt, daß, von der 1. resistenten Kurve (Kurve 1 in Fig. 4) abgesehen, alle ein schwächeres Wachstum zeigen, als es in den mit jungen Kulturen angestellten Versuchen der Fall war. Deshalb die verhältnismäßig geringe Höhe der Kurven 2 und 3 in Figur 4. — Reicht die vorhandene oder bildbare Antiprotease noch aus, um die anfängliche Auflösungsgefahr zu überwinden, hält aber nicht Schritt mit der Bildung mit Proteasen, so werden sich die Zellen demgemäß vermehren, dann aber plötzlich der Lyse anheimfallen (Kurve 4 und 5 der Fig. 4). — In den Filtraten mit antiproteolytischer Substanz werden sich gerade diese Zellen, die die Fähigkeit der Antiproteasebildung eingebüßt haben, entwickeln, falls sie nicht zu schwach sind, die lange Wachstumshemmung zu überstehen. Können sie das nicht, so werden sie entweder gleich zugrunde gehen oder, wenn sie sich zu vermehren beginnen, infolge der plötzlich einsetzenden Gleichgewichtsstörung (Kurve 1 in Fig. 4a)[1]).

Wie ist es aber erklärlich, daß diese „Normalkurven" (d. h. Kurven mit einem normalen Abfall) auf den Filtraten einen höheren Maximalpunkt erreichen, als auf gewöhnlicher Nährlösung? Es ließe sich das nur mit der schon erwähnten Annahme erklären, daß die Zellen gegen das thermolabile entwicklungshemmende Prinzip widerstandsfähig geworden sind. Sie würden also in ihrem Maximalpunkt nicht von diesem, sondern nur von ihrer Widerstandskraft der Autolyse gegenüber abhängig sein, falls sie nicht, wie das bei der Kurve nach dem resistenten Typ wahrscheinlich ist, sich bis zur Nahrungserschöpfung vermehren.

Statt diese Überlegungen fortzuführen, wurde versucht, den verschiedenen Möglichkeiten nach einheitliches Material zu gewinnen. Zuerst wurde der Versuch gemacht, eine 24stünd. Kultur so umzuzüchten, daß sie die

[1]) Bei der geringen Zahl der eingeimpften Keime kann natürlich die Sterilität des einen oder anderen Kolbens auch durch Ursachen, die in der verschiedenen Löslichkeit des Glases liegen, verursacht werden. (Lappalainen, H., Biochemische Studien an Aspergillus niger. 1919.)

Eigenschaft der Antiproteasewirkung verliert. Deshalb wurde sie in ein 8 Tage vorbehandeltes, auf 100° erhitztes Bouillonfiltrat geimpft (in dem also die Protease zerstört, die Antiprotease noch wirksam war). Sofort nachdem sich geringe Trübung zeigte, wurde von dieser Kultur wieder in ein erhitztes Filtrat übergeimpft, von diesem wieder usw. Der Prozeß wurde etwa 3 Wochen lang fortgeführt. Wurde dann von der letzten Kultur in gewöhnliche Bouillon geimpft, so trat in keinem der 12 geimpften Kolben Wachstum ein. Wurde aber der Bouillon etwas des auf 100° erhitzten, also antiproteasehaltigen Filtrates zugesetzt, so zeigte sich bald Trübung. Nur darin zeigte sich nicht überall Übereinstimmung, daß einige Male schon eine ganz geringe Filtratmenge — 1 : 100 — genügte, um ein normales Wachstum hervorzurufen, in anderen Fällen dagegen die Vermehrung je nach der Menge des

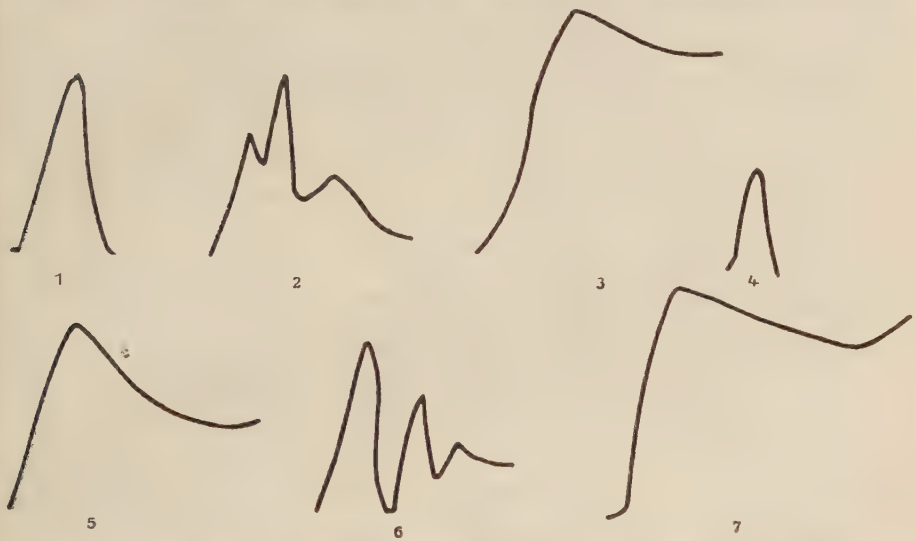

Fig. 18. Wachstumsverlauf auf Bouillon nach Impfung mit einer alten Schrägagarkultur. 1—6 Impfmaterial vom Rasen, — 7 von den Sekundärkolonien entnommen. Temp. 22°. Schematisch.

Filtrates mehr oder weniger beschränkt blieb. Im ersteren Fall genügte es also, die Zellen über die Anfangsschwierigkeiten hinwegzubringen, im letzteren haben sie die Fähigkeit der Antiproteasebildung vollständig eingebüßt, weil sie sich eben daran gewöhnt hatten, Antiprotease vorzufinden. Ein Kolben blieb auch mit Filtratzusatz steril.

Dasselbe Resultat zeigte sich, wenn an Stelle des Filtrates ein Weißkohlextraktzusatz verwendet wurde. Nur war die Vermehrung eine noch viel stärkere. Haehn und Schifferdecker wiesen nach, daß die gärungsvergrößernde Wirkung gewisser Katalysatoren bei Hefesäften auf ihrer antiproteolytischen Wirksamkeit beruht. Weißkohlextrakt, der auch gärungsbeschleunigend wirkt, zeigt dieselbe antiproteolytische Wirksamkeit. Es scheint also, daß der Kohlextrakt in unserem Falle — wenigstens teilweise — auch durch seinen Antiproteasegehalt wirkt.

Interessant war, daß der Kohlextrakt auf eine andere — nicht auf Filtraten gezogene Kultur — (die sich also im Besitze ihrer antiproteasebildenden Fähigkeit befand) in Bouillon einen viel günstigeren Einfluß ausübte, als in

Ammoniumphosphatlösung. Bei letzterer war kaum ein Unterschied im Wachstum mit oder ohne Extraktzusatz zu merken, während in Bouillon mit Extraktzusatz als Höchstzahl über die doppelte Menge Keime mehr, als ohne Zusatz erreicht wurden.

Ganz anders verliefen die Versuche, wenn sie mit einer alten Kultur vorgenommen wurden. Diese wurde durch Ausstrich einer alten Bouillonkultur in Agar gewonnen, welcher statt in Wasser in Kulturfiltrat aufgelöst wurde. Nach 2—3 Wochen wurde wieder übergeimpft, von dieser letzten Kultur wurden dann, als sich schon Sekundärkolonien gebildet hatten, 15 Bouillonkolben beimpft, und zwar wurden 3 Impfungen von einer Sekundärkolonie, die anderen vom Rasen vorgenommen. 3 vom Rasen beimpfte Kolben blieben steril, in den anderen verlief das Wachstum auf die verschiedenste Weise. —

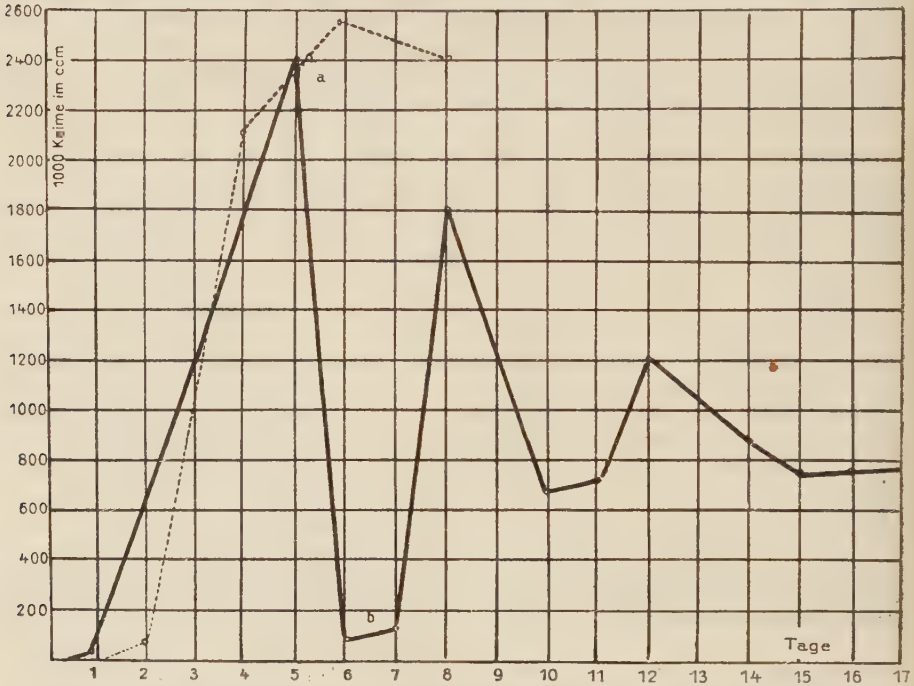

Fig. 19. Genaue Darstellung des Schema 6 der Figur 18. Punktiert eine Kontrolle, mit 24 stündiger Kultur geimpft.

In Figur 18 sind diese Kurven schematisch wiedergegeben, welche — das soll hier nochmals betont werden — immer das Ergebnis von 3 Zählungen sind. Diese Zählungen stimmten genau überein. Die größte Abweichung war einmal ein Unterschied von ca. 28 000 Keimen an einem Punkt, wo die Gesamtkeimzahl ca. 1 000 000 Keime betrug.

Die von den Sekundärkolonien beimpften Kolben zeigen alle ein normales starkes Wachstum nach dem resistenten Typ (Fig. 18). Von den anderen Kurven ist die interessanteste das Schema 6, welches in Figur 19 genau wiedergegeben ist. Ihre Ähnlichkeit mit dem lytischen Vorgang beim d'Herelleschen Phänomen ist nicht von der Hand zu weisen. Und zwar würde sie dem von d'Herelle selbst beschriebenen Fall entsprechen, in dem lytisches und antilytisches Prinzip (nach d'Herelle Bakterio-

phage und Bakterien) ungefähr gleich stark sind. Es ist interessant, wie die 2 Extreme der Kurve sich gleichmäßig einem Mittelwerte zu abschwächen. Das interessanteste aber war das Ergebnis der Abimpfung. Wurde zu einer Zeit abgeimpft, die in der Kurve Figur 19 dem Punkte a entspricht, so blieb von den 6 beimpften Kolben 1 steril, in den anderen zeigten sich die verschiedensten Abstufungen von starkem normalem Wachstum bis zu ganz schwachem mit plötzlicher Lyse (a_1—a_4 in Fig. 19a). Wurde dagegen zu einer Zeit abgeimpft, die in der Kurve der Zeit b entspricht, so zeigten 5 der 6 Kolben überhaupt keine Trübung, der 6. zeigte starkes Wachstum (Kurve b_1 in Fig. 19a).

Es haben sich also die Zellen auf die lytische Eigenschaft hin sozusagen aufgespalten. Im Kurventeil a) waren noch alle Zellen vorhanden, so die widerstandsfähigen, wie die in ihrer Widerstandskraft mehr oder weniger geschwächten. Deshalb waren nach der Abimpfung die verschiedensten Entwicklungsmöglichkeiten vorhanden. Im Kurventeil b) waren nur mehr die resistenten Keime entwicklungsfähig oder überhaupt vorhanden (makroskopisch zeigte sich eine geringe Aufhellung, die aber dem Sinken der Keimzahl bis fast zum Nullpunkte nicht entsprach), deshalb blieben die meisten Kolben steril, wo aber Vermehrung eintrat, mußte sie nach dem resistenten Typ erfolgen. — Ob es sich bei dieser Aufspaltung um einen bloßen Zufall handelte, in dem das Zellmaterial so glücklich in die einzelnen Kolben verteilt wurde, daß alle Möglichkeiten zur Entfaltung gelangen konnten, oder um eine echte Spaltung der Eigenschaften, hätte nur durch eingehende Einzellkulturversuche untersucht werden können, und konnte deshalb in diesem Rahmen nicht entschieden werden.

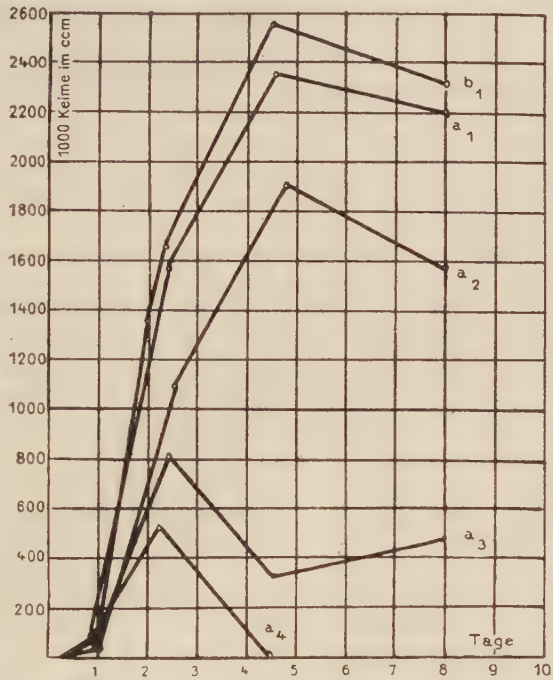

Fig. 19 a. Bouillon-Impfmaterial zu a_1—a_4 zu einer dem Punkte a in Fig. 19 entsprechenden Zeit, zu b_1 einer dem Punkte b entsprechenden Zeit entnommen. Temp. 22°.

Das Weiterzüchten des Virus im d'Herelle schen Sinne gelang nicht; allerdings wurde zum Filtrieren de Haën sche Membran und nicht Berkefeldkerze verwendet, die bei der Weiterzüchtung des Virus anscheinend von Bedeutung ist.

Die anderen Schemen der Figur 18 zeigen, daß die Kurve 6 nicht übergangslos dasteht, wir sehen neben normal aufsteigenden Kurven (Nr. 4) solche mit einsetzender Lyse, die wieder überwunden wird (Kurve 2), solche,

die nur eine ganz geringe Vermehrung zeigen, und andere, bei denen der Sturz der Keimzahl erst nach einer erheblichen Vermehrung erfolgt (Kurve 1). Ähnlich haben wir es ja auch schon im III. Abschnitt bei den ersten Versuchen mit alten Kulturen beobachtet. Die Maximalwerte zeigen überall den Punkt an, bei dem die Gleichgewichtsstörung auftritt, die wir uns hier nicht mehr anders als durch erblich gewordene Variation der zum Impfen benutzten Zellen erklären können.

Die Resistenz dem thermolabilen Stoff gegenüber zeigt Kurve 3 in Figur 8. Ihr Impfmaterial war eine alte Kultur vom resistenten Typ. Während die junge Kultur nach Zusatz von unerhitztem Filtrat sofort ihre Vermehrung einstellte, schreitet die alte Kultur in ihrem Wachstum fort.

VIII. Zusammenfassung.

Ziehen wir 24stünd. Kulturen von B. vulgaris in mit seiner Art vorbehandelten und keimfrei filtrierten, eiweißhaltigen Nährlösungen, so tritt eine mit der Dauer der Vorbehandlung zunehmende Verzögerung des Wachstums und Verringerung der maximalen Keimzahl ein. Werden die Filtrate vorher auf 100° erhitzt, so bleiben die Unterschiede in der Wachstumsverzögerung bestehen, dagegen ist keine Verringerung der Maximalzahl bemerkbar. Sie wird nur infolge der Wachstumsverzögerung in der ersten Zeit zeitlich verschoben. Die Herabsetzung der Maximalzahl wird also durch einen thermolabilen Stoff verursacht.

Die anfängliche Hemmungsvergrößerung ist die Folge der Wirksamkeit eines kochfesten Prinzips. In erhitzten, eiweißfreien Kulturfiltraten tritt sie nicht in Erscheinung. Gelatine-Verflüssigungsversuche ergeben, daß es sich um ein kochfestes, antiproteolytisches Prinzip handelt, welches sich in den Leibern der Bakterien vorfindet, und ebenso in dem auf 100° erhitzten Filtrat eiweißhaltiger Nährlösungen. In das Substrat eiweißfreier Lösungen gelangt es nur beim Absterben der Keime.

Die Wirksamkeit dieser antiproteolytischen Substanz scheint also darin zu bestehen, die Auflösung der Zellen durch ihre eigenen Proteasen zu verhindern. Sie muß danach überall dort zur Geltung kommen, wo die Gefahr der Selbstauflösung groß ist. Das ist in eiweißhaltiger Lösung gleich zu Beginn der Vermehrung der Fall, in jeder Nährlösung nach Erreichen der maximalen Keimzahl. Deshalb sehen wir auch, daß der Abfall der Keimzahlkurve um so geringer ist, je größer die Menge der vorhandenen antiproteolytischen Substanz. Über die Wirkungsweise dieser schon ausgeschiedenen antiproteolytischen Substanz könnten nur Annahmen gemacht werden.

Die Form der Keimzahlkurve ist die Folge eines Gleichgewichtsverhältnisses. Bei einem sicher einheitlichen 24stünd. Material ist dieses Verhältnis unter denselben Bedingungen immer das gleiche. Deshalb lassen sich aus der Art der Kurven die oben erwähnten Folgerungen ziehen.

Alte Kulturen geben dem gegenüber kein einheitliches Bild. Nehmen wir den Wachstumsverlauf junger Kulturen als die Norm an, so zeigen alte Kulturen zumeist schwere Gleichgewichtsstörungen, die zu einer vollständigen Veränderung des Kurvenbildes führen. Diese Veränderungen können entweder die direkte Folge davon sein, daß die Keime sich den gegebenen Gleichgewichtsbedingungen nicht anpassen können, oder die indirekte, indem als Auswirkung der in alten Kulturen vor sich gehenden Erscheinungen (Anpassung und Auslese, Resistenzgewinnung und Sensibilisierung) voneinander sehr verschiedene Varianten entstehen.

Durch dauernde Züchtung junger Kulturen auf Filtraten ihrer eigenen Kulturflüssigkeit wurde ein Stamm gewonnen, der die Fähigkeit zur Antiproteasenbildung dauernd eingebüßt hat. Erwuchs auf frischer Bouillon nur nach Zusatz von Kulturfiltrat oder Weißkohlextrakt. Die Wirksamkeit des Weißkohlextraktes dürfte dabei auch in seiner antiproteolytischen Wirksamkeit liegen. — Wurde eine alte Kultur auf Filtraten ihrer eigenen Kulturflüssigkeit gezogen, so ergaben sich nach Überimpfung in gewöhnliche Bouillon die verschiedensten Wachstumsschemen. In einem Falle waren die Keimzahlschwankungen infolge der Gleichgewichtsstörung so groß, daß sie mit dem intermittierenden Typus des d'Herelleschen Phänomens verglichen werden konnten. In den Abimpfungen wurde aber kein fortzüchtbares Virus, sondern in ihrer Resistenz gegen die Lyse verschiedene Varianten gewonnen. Die anderen Kurven zeigten die verschiedensten Übergänge von diesem Schema zum resistenten Typus. Der seinem Wachstumsverlauf nach resistente Typus entspricht den Keimen der Sekundärkolonien.

Alte Kulturen sind dem thermolabilen Stoff gegenüber mehr oder weniger resistent[1]).

Literatur.

Buchner u. Hahn, Biochem. Ztschr. Bd. 26. 1910. — Bürgers u. Bachmann, Ztschr. f. Hyg. Bd. 101. 1924. S. 350. — Conradi u. Kurpjuweit, Münch. med. Wochenschr. 1906. S. 1761, 2164 u. 2228. — C. Eijkman, Centralbl.

[1]) Die den Abbildungen zugrunde liegenden Zahlen sind — da sie aus den Abbildungen selbst ersichtlich sind — aus Raumersparnis weggeblieben. Sie sind in dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie, Göttingen, einzuholen.

f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 37. 1904. S. 436 u. 441; 1906. S. 367 u. 431. — Emmerich u. Löw, Ztschr. f. Hyg. Bd. 31. S. 1 u. Münch. med. Wochenschr. 1898. S. 1433. — Gottschlich u. Weigang, Ibid. Bd. 20. 1895. S. 376. — Haehn, u. Schifferdecker, Biochem. Ztschr. Bd. 138. 1923. S. 209. — d'Herelle, Der Bakteriophage, übers. von Pfrimbter, Sell, Pistorius. Braunschweig 1922 — (und die neuere Literatur über das d'Herellesche Phänomen). — Heheswerth, Arch. f. Hyg. Bd. 39. 1901. S. 321. — Kruse, Mikrobiologie. 1910. — Lode, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 33. 1903. S. 196. — Manteufel, Ztschr. f. Hyg. Bd. 57. 1907. S. 337. — Öbius, Med. Klin. 1906. S. 598. — Pansini, Wien. klin. Wochenschr. 1906. S. 627. — O. Rahn, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 16. 1906. S. 426 u. 614. — A. Rippel, Wachstumsgesetze bei höheren und niederen Pflanzen. (Samml. „Naturwissensch. u. Landwirtsch." Herausgeg. von Boas. 1924. H. Nr. 4.) — Rolly, Dtsch. med. Wochenschr. 1906. — Schmidt u. Greifenstein, Münch. med. Wochenschr. 1924. — Tagung d. Vereinig. f. Mikrobiol.; Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 89. 1922.

Lebenslauf.

Ich bin am 31. März 1902 in Budapest (Ungarn) geboren. Im Sommersemester 1920 wurde ich an der Universität Halle a. S. immatrikuliert, wo ich mich dem Studium der Naturwissenschaften und der Landwirtschaft widmete. Im Sommer 1922 erhielt ich hier das landwirtschaftliche Diplom. Das darauffolgende Semester wurde ich in Göttingen immatrikuliert, wo ich seitdem studiert habe. Ich hörte Vorlesungen der Herren Professoren Berthold, Burgeff, Fuchs, Hilbert, Jensen, Reichenbach, Rippel und Windaus. Bei Herrn Prof. Berthold, Jensen, Reichenbach und Rippel habe ich praktisch gearbeitet.

Herrn Prof. Rippel möchte ich für seine stete freundliche Förderung meiner Studien und meiner Arbeit meinen besten Dank aussprechen.

Fürstl. priv. Hofbuchdruckerei (F. Mitzlaff) Rudolstadt